



# Détection et Physico-chimie d'Objets Uniques

Nadine Mourougou-Candoni

► To cite this version:

Nadine Mourougou-Candoni. Détection et Physico-chimie d'Objets Uniques. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, 2010. tel-00653247

**HAL Id: tel-00653247**

**<https://theses.hal.science/tel-00653247>**

Submitted on 19 Dec 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ d'AIX-MARSEILLE II  
UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE

Mémoire présenté pour l'obtention  
d'une Habilitation à Diriger des Recherches

*Par Nadine MOUROUGOU-CANDONI*

## Détection et Physico-chimie d'Objets Uniques

Soutenue le 13 décembre 2010

Membres du jury :

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| M. FRÉTIGNY Christian | Rapporteur |
| M. IBANEZ Alain       | Rapporteur |
| M. KLEIN Jean-Paul    | Rapporteur |
| M. HENRY Claude       | Examineur  |
| M. RIEU Régis         | Examineur  |
| M. DUMAS Philippe     | Tuteur     |

## Remerciements

Je remercie messieurs Christian Frétigny, Alain Ibanez et Jean-Paul Klein pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce mémoire. J'exprime également ma reconnaissance à messieurs Régis Rieu et Claude Henry pour leurs encouragements et leur participation au jury. Ce manuscrit est l'aboutissement de plusieurs années de travail, mais il n'aurait pas vu le jour sans la bienveillance de Philippe Dumas.

Mon travail au laboratoire a débuté dans l'équipe « surface bio-fonctionnalisées » avec Franck Thibaudau et Anne Charrier. Je les remercie vivement pour le travail d'équipe que nous avons accompli ensemble. J'ai commencé au GPEC sous la direction de Franck Salvan que je remercie pour son accueil ainsi que tous les « collègues du 4<sup>ème</sup> étage ». Je remercie également les membres du Département « Sources et Sondes Ponctuelles » que j'ai rejoint par la suite ; et plus particulièrement ceux avec qui j'apprécie de travailler sur deux projets récents : Hubert Klein et Stéphane Veessler.

Ce mémoire d'habilitation est également le fruit d'un travail collectif mené avec des « non permanents » : Cathy Naud, Isabelle Meunier et Olivier Guillermet, attachés temporaires d'enseignement et de recherches ; Ugo Baudez, Palakorn Punniyam et Jean-Christophe Renaud, étudiants d'IUT ; Julien Boisse, Jean-Matthieu Barbier et Sabrina Homri, étudiants de M2-Recherche ; Thomas Léoni, Manuel Ildefonso et Monzer Alwan, étudiants en thèse.

Enfin j'exprime ma profonde gratitude à ma famille :  
A mes enfants Alexandre, Guillaume et Stéphane pour toute leur patience,  
A mon époux Philippe, pour son précieux soutien.

# Notice personnelle

## Activités professionnelles et diplômes

**Maître de Conférences** - 28<sup>ème</sup> Section du CNU (depuis 2000)  
Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille (UPR CNRS 3118)

**Qualification en :** - 28<sup>ème</sup> section « *Milieux denses et Matériaux* »  
- 31<sup>ème</sup> section « *Chimie théorique, physique et analytique* »

**Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche- GPEC** (1999-2000)

**Mission :** Etude par microscopie de force d'ADN greffés sur un substrat

**Post-Doc : Collaboration CNRS/Société Renault** (1998-1999)

**Mission :** Etude du mouillage forcé des pulvérisations de peinture

**Doctorat de Matière Condensée - Chimie et Organisation** (1998)

de l'Université "Pierre et Marie Curie" (Paris VI) - Mention très honorable

**Thèse au Laboratoire des Phénomènes de Transport dans les Mélanges** (1995-1998)

**Projet :** Etude du mouillage forcé, Contrat de Collaboration CNRS/Rhodia

**Ingénieur** de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie et Physique de Bordeaux (1992)

**Stage au Laboratoire de Chromatographie sur Matériaux Greffés de Bordeaux** (1992)

**Mission :** Etudes de colonnes de silice employées en HPLC

**Stage Ingénieur au Centre de Recherche d'Exxon Chemical-Bruelles** (1991)

**Mission :** Chimie et résistance physique à la fracture de matériaux polymères

## Enseignements :

**Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Luminy (ESIL) - Département Génie Biomédical**

Volume horaire : CM = 64h ; TP = 136h

Disciplines : Automatique : cours, TD et TP pour des élèves de 2<sup>ème</sup> année (niveau M1)

Electronique : TP auprès des élèves de 1<sup>ère</sup> année (niveau L3)

Physique Nucléaire : - TP auprès des élèves de 1<sup>ère</sup> année (niveau L3)

Neurophysiologie : TP auprès des élèves de 2<sup>ème</sup> année (niveau M1)

Responsable Pédagogique des 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> années ;

Tutorat de stage de 2<sup>ème</sup> année (13 étudiants) et de 3<sup>ème</sup> année (8 étudiants)

## Responsabilités administratives :

- Membre élue du Conseil d'Administration de l'ESIL
- Membre de Comités de sélections
- Personne Compétente en Radioprotection (PCR) de l'ESIL



## **Thème de Recherche :    Détection et physico-chimie d'objets uniques**

- Nucléation d'un cristal unique dans un système microfluidique (*depuis 2009*)
- Contacts atomiques et moléculaires (*depuis 2007*)
- Surfaces bio-fonctionnalisées pour la détection de molécules uniques (*2000-2007*)

## **Encadrement :**

### **Encadrement d'étudiants :**

Co-directrice de thèse de Manuel Ildefonso avec Stéphane Veesler (depuis 2009)

Thèse : *Microfluidique pour l'étude de la cristallisation*

Co-encadrement de thèse de Monzer Alwan avec Hubert Klein (depuis 2009)

Thèse : *Mesure de la conductance d'une molécule unique*

Co-encadrement de thèse de Thomas Léoni avec Philippe Dumas et Hubert Klein (2007-2009)

Thèse : *Contribution à l'étude des contacts atomiques et moléculaires ponctuels*

Co-encadrement de Sabrina Homri avec Philippe Dumas (2008)

Stage M2-Recherche : *Sous le quantum, la molécule*

Co-encadrement de Julien Boisse avec Franck Thibaudau et Anne Charrier (2005)

Stage M2-Recherche : *Adsorption et désorption de particules colloïdales fonctionnalisées*

Co-encadrement de Jean-Matthieu Barbier avec Franck Thibaudau (2002)

Stage M2-Recherche : *Mise au point d'une micro-puce à ADN*

### **Formation d'Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche :**

Olivier Guillermet, ATER CINA-M-ESIL (2003-2004)

Isabelle Meunier, ATER CRM-CN-ESIL (2001-2002)

Cathy Naud, ATER GPEC-ESIL (2000-2001)

## **Autres Responsabilités**

Reviewer pour la revue *Langmuir*

Co-Editeur pour le numéro spécial du *Journal of Crystal Growth*

Membre du comité scientifique du Forum Microscopies en Champ Proche

### **Organisation de Congrès :**

Congrès Cristal 6 - Cristallisation et Précipitations Industrielles - *Marseille* (2010)

Forum Microscopies en Champ Proche - *La Londe les Maures* (2008)

Forum Microscopies en Champ Proche - *Sainte-Beaume* (2001)

### **Actions de Promotion de la Science vers le « grand public » :**

Fête de la Science, Animation du stand *Microscopies en Champ Proche* (2007)

### **Activités internationales :**

Collaboration avec le Laboratoire de Chimie de l'Université de Gunma au Japon-PrTetsuo Okutsu, co-financement de la Direction des Relations Internationales de l'Université de la Méditerranée :

Accord de co-tutorat de thèse et d'échanges d'étudiants (2010)

Contrat de coopération avec le Centre d'Etudes et de Recherche de Djibouti-Dr Mohamed Nabil, Laboratoire de Biotechnologie végétale : séjour de 3 mois (2006)

## Publications:

- Influence of dynamic surface tension on the spreading of surfactant solutions impacting onto a low surface-energy solid substrate, **N. Mourougou-Candoni**, B. Prunet-Foch, F. Legay, M. Vignes-Adler, K. Wong, *J. Colloid Interface Sci.*, **192**, 129-141 (1997)
- A study of Impacting droplets of an emulsion or surfactant solution on solid substrates, M. Vignes-Adler, B. Prunet-Foch, F. Legay, **N. Mourougou**, *Dynamics in small confining system III*, (Eds J. Drake, J. Klafter, R. Kopelman), **464**, 105-1147 (1997)
- Etude du mouillage forcé, **N. Mourougou-Candoni**, *Thèse*, Université Paris VI, (1998).
- Retraction phenomena of surfactant solution drops upon impact on a solid substrate of low surface energy, **N. Mourougou-Candoni**, B. Prunet-Foch, F. Legay, M. Vignes-Adler, K. Wong, *Langmuir*, **15**, 19, 6563-6574 (1999)
- Brevet : Méthode de microdéposition de molécules sur un substrat en utilisant un AFM  
N. Candoni et F. Thibaudau (FR2848476)
- Adsorption of Thiolated Oligonucleotides on Gold Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study, **N. Mourougou-Candoni**, C. Naud, F. Thibaudau, *Langmuir*, **19**, 682-686 (2003)
- Surfaces for the observation by Atomic Force Microscopy of DNA hybridization with oligonucleotides, **N. Mourougou-Candoni**, F. Thibaudau, C. Nguyen, en préparation pour *J. Phys. Chem. B* (2010)
- Formation of aminosilane film on mica, **N. Mourougou-Candoni** and Thibaudau, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 39, 13026-13034 (2009)
- A DNA Detection Method Based on the 2D Aggregation and Selective Desorption of Nanoparticle Probes, A. Charrier, **N. Candoni**, F. Thibaudau, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 12896 (2006)
- 2D aggregation and selective desorption of nanoparticles probes : A new method to probe DNA mismatches and damages, A. Charrier, **N. Candoni**, N. Liachenko, F. Thibaudau, *Biosens. Bioelect.*, **22**, issues 9-10, 1881-1886 (2007)
- Are conductance plateaus independent events in atomic point contact measurements? A statistical approach, T. Léoni, R. Zoubkoff, S. Homri, **N. Candoni**, P. Vidakovic, A. Ranguis, H. Klein, A. Saúl and Ph. Dumas, *Nanotechnology*, **19**, 355401 (2008)
- Biocatalysts for fuel cells : efficient hydrogenase orientation for H<sub>2</sub> oxidation at electrodes modified with carbon nanotubes, E. Lojou, X. Luo, M. Brugna, **N. Candoni**, S. Dementin, M. T. Giugici-Orticoni, *J Biol Inorg Chem*, **13**(7):1157-67 (2008)
- Tools for conductance measurements of metallic and molecular nanowires, T. Léoni, H. Klein, **N. Candoni**, A. L. Lereu and Ph. Dumas, *Global Journal of Physical Chemistry*, accepté 2010
- STM-BJ and MCBJ of gold nanowires: Statistics of ballistic plateaus, **N. Candoni**, M. Alwan, T. Léoni, H. Klein and Ph. Dumas, en préparation pour *Nanotechnology*, 2010
- Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool, M. Ildefonso, E. Revalor, P. Punniyam, J. B. Salmon, **N. Candoni**, S. Veessler, *Journal of Crystal Growth*, accepté 2010
- Using microfluidics for fast accurate measurement of nucleation kinetics, M. Ildefonso, **N. Candoni**, S. Veessler, soumis à *Crystal Growth and Design*, octobre 2010

## Conférences :

### Conférences Internationales :

- "A study of impacting droplets of an emulsion or surfactant solution on solid substrate" M. Vignes-Adler, B. Prunet-Foch, F. Legay, **N. Mourougou**, *Annual meeting of the Materials Research Society*, Boston, décembre 1996, Conférence invitée avec actes
- "Impacting droplets of an emulsion or surfactant solution on solid substrates" M. Vignes-Adler, B. Prunet-Foch, F. Legay, **N. Mourougou**, *9th International Conference on Surface and Colloid Science*, Sofia, Juillet 1997 (Poster)
- "Etude des effets dynamiques sur l'impact des gouttes de solutions tensioactives et d'émulsion" M. Vignes-Adler, B. Prunet-Foch, F. Legay, **N. Mourougou**, *Journée d'Etude Société Française des Thermiciens*, janvier 1998 (Oral)
- "Impacting emulsions and surfactant solution drops on solid substrate: spreading instabilities, influence of dynamic surface tension" B. Prunet-Foch, **N. Candoni**, F. Legay, M. Vignes-Adler *9th International Coating and Technology Symposium*, Delaware, mai 1998 (Oral)
- "Impacting surfactant solution drops on solid substrate" M. Vignes-Adler, B. Prunet-Foch, **N. Candoni**, F. Legay *Workshop on Interfacial Phenomena, Satellite meeting of IUPAP-PHYSTAT 20 Conference*, Madrid, juillet 1998, Conférence invitée
- "The role of dynamic surface tension on the impact of surfactant solution drops on a solid substrate", **N. Mourougou-Candoni**, B. Prunet-Foch, M. Vignes-Adler, *Royal Society of Chemistry Faraday Division Colloid and Interface Science Group*, University of Hull, Septembre 1999 (Oral)
- "Surfactant Solutions Drops Impacting On Low Surface Energy Solid Substrate: Retraction Phenomena" B. Prunet-Foch, **N. Mourougou-Candoni**, M. A. Vignes-Adler *10th International Coating Science and Technology Symposium*, Scottsdale, AZ, USA, Septembre 2000 (Oral)
- "Towards an AFM detection of hybridization for DNA chip" **N. Candoni**, F. Thibaudau, *First International Meeting on Applied Physics (APHYS 2003)*, Badajoz - Spain, Octobre 2003 (Oral)
- "Nano-spotting of oligonucleotides for DNA micro-chip fabrication", J.M. Barbier, **N. Candoni**, F. Thibaudau, *International Symposium on Materials Processing for Nanostructured Devices*, Nouan le Fuselier, Mai 2003 (Oral)
- "2D aggregation and selective desorption of nanoparticle probes: A new method to probe DNA mismatches and damages", A. Charrier, **N. Candoni**, N. Liachenko and F. Thibaudau, *9th World Congress on Biosensors*, Toronto, Canada, Mai 2006 (Oral)
- "Microfluidic tool for crystallization study", M. Ildefonso, P. Punniyam, **N. Candoni**, S. Veessler, *International School of Crystallization*, Granada, Spain, Mai 2010 (Poster and Demonstrations Fair)
- "The control of nucleation with microfluidic tools", M. Ildefonso, P. Punniyam, E. Revalor, **N. Candoni**, S. Veessler, *9th International Workshop on Crystal Growth of Organic Materials*, Singapore, Août 2010 (Oral)
- "Microfluidic tool for nucleation study", M. Ildefonso, P. Punniyam, E. Revalor, **N. Candoni**, S. Veessler, *Laboratoire de Tetsuo*, Gunma, Japan, Août 2010 (Séminaire invité)

### Conférences Nationales :

- "Puce à ADN pour l'analyse du transcriptome d'une cellule unique", **N. Mourougou-Candoni**, F. Thibaudau, J. M. Barbier, I. Meunier, C. Naud, *Programme "Puces à ADN", Cargèse*, mai 2001, Conférence invitée
- "Etude de l'adsorption d'oligonucléotides sur une surface d'or par microscopie de force atomique", **N. Candoni**, C. Naud, F. Thibaudau, *Forum des Microscopies à Sondes Locales, Sainte-Beaume*, Juin 2001 (Oral)
- "Micro-puce à ADN pour la mesure du transcriptome d'une cellule", **N. Candoni**, F. Thibaudau, *Forum des Microscopies à Sondes Locales, Montpellier*, Mars 2003 (Oral)
- "Réalisation de micro-puce à ADN par AFM", J-M. Barbier, F. Thibaudau, **N. Candoni**, *Forum des Microscopies à Sondes Locales, Montpellier*, Mars 2003 (Oral)
- "Micro-puce à ADN pour la mesure du transcriptome d'une cellule : Etude de l'adsorption d'oligonucléotides sur une surface d'or par microscopie de force atomique", **N. Candoni**, C. Naud, F. Thibaudau, *Ecole de Science des Surfaces de Porquerolles*, Septembre 2003 (Oral)
- "Quantum de conductance dans une nano-jonction brisée d'or. De l'analyse statistique aux processus physiques", T. Léoni, H. Klein, **N. Candoni**, P. Vidakovic and Ph. Dumas, *Forum des Microscopies à Sondes Locales, La Londe les Maures*, Mars 2008 (Oral)
- "Microfluidique pour la cristallisation", M. Ildefonso, S. Veesler et **N. Candoni**, *Ecole de Physique, Les Houches*, janvier 2010 (Poster)
- "Nanomécanique des jonctions brisées", **N. Candoni**, M. Alwan, Th. Leoni, H. Klein et Ph. Dumas, *12<sup>ème</sup> Forum des Microscopies à Sondes Locales, Mittelwhir*, Mars 2010 (Poster)
- "Étude de la cristallisation d'une protéine modèle à l'aide d'une puce microfluidique", M. Ildefonso, P. Punnam, S. Veesler et **N. Candoni**, *Congrès Cristal 6 : Cristallisation et Précipitations Industrielles, Marseille*, Mai 2010 (Poster)
- "Etude de la nucléation et du polymorphisme via un outil microfluidique simple d'utilisation", **N. Candoni**, M. Ildefonso, S. Veesler, *ANGD Cristech, Autran*, Octobre 2010 (Oral)



## Table des Matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Préambule</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Chapitre 1:</b>   |           |
| <b>Surfaces bio-fonctionnalisées pour le greffage et la détection de molécules uniques</b>       | <b>8</b>  |
| <u>Introduction</u>  | <b>9</b>  |
| <u>Partie 1</u> : Fonctionnalisation d'une surface de mica par un aminosilane                    | <b>11</b> |
| I. Adsorption en phase aqueuse   | <b>11</b> |
| I.1. Rôle du pH en phase aqueuse   | <b>11</b> |
| I.2. Interactions des molécules avec la surface  | <b>12</b> |
| I.3. Configuration des molécules sur la surface  | <b>13</b> |
| II. Adsorption de l'AAPS en phase vapeur   | <b>14</b> |
| II.1. Structure du film d'AAPS sur la surface  | <b>14</b> |
| II.2. Configuration des molécules sur la surface   | <b>16</b> |
| III. Conclusion sur le système AAPS/mica   | <b>16</b> |
| <u>Partie 2</u> : Fonctionnalisation d'une surface d'Au par un oligonucléotide                   | <b>17</b> |
| I. Adsorption : Physisorption ou chimisorption?  | <b>17</b> |
| II. Mécanisme de l'adsorption  | <b>18</b> |
| II.1. Première étape d'adsorption  | <b>18</b> |
| II.2. Seconde étape d'adsorption   | <b>18</b> |
| II.3. Effet limitant : répulsion électrostatique ou facteur cinétique ?                          | <b>19</b> |
| III. Conclusion sur le système oligonucléotides/Au   | <b>19</b> |
| <u>Partie 3</u> : Détection de l'hybridation par AFM   | <b>20</b> |
| I. Passivation de la surface oligonucléotides/Au   | <b>21</b> |
| II. Hybridation de la surface oligonucléotides/Au passivée au mercaptohexanol                    | <b>22</b> |
| III. Conclusion sur l'hybridation de l'ADN   | <b>24</b> |
| <u>Conclusion générale</u>   | <b>25</b> |
| <i>Bibliographie du chapitre 1</i>   | <b>26</b> |
| <u>Publications</u> : - Formation of aminosilane film on mica                                    |           |
| - Adsorption of thiolated oligonucleotides on gold surfaces:<br>An Atomic Force Microscopy study |           |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Chapitre 2 : Contacts atomiques et moléculaires</b>   | <b>30</b> |
| <i>Introduction</i>  | 31        |
| I. Formation de la nanojonction d'Au   | 32        |
| I.1. Principes   | 32        |
| I.2. Transport balistique  | 33        |
| II. Rupture de la nanojonction d'Au  | 34        |
| II.1. Durée de vie et longueur des plateaux  | 34        |
| II.2. Mécanisme de rupture   | 35        |
| III. Conclusion  | 36        |
| <i>Bibliographie du chapitre 2</i>   | 37        |
| <u>Publications</u> :  |           |
| - Are conductance plateaus independent events in atomic point contact measurements? A statistical approach |           |
| - Tools for conductance measurements of metallic and molecular nanowires                                   |           |
| <b>Chapitre 3 : Nucléation d'un cristal unique dans un système microfluidique</b>                          | <b>40</b> |
| <i>Introduction</i>  | 41        |
| I. Statistique de nucléation   | 42        |
| I.1. Mélange du soluté et du solvant   | 42        |
| I.2. Formation des gouttes   | 42        |
| I.3. Méthode de double puce microfluidique   | 43        |
| II. Zone métastable et phase métastable  | 43        |
| II.1. Détermination de la zone métastable  | 43        |
| II.2. Nucléation mononucléaire vs polynucléaire  | 44        |
| II.3. Polymorphisme  | 44        |
| III. Fréquence de nucléation   | 45        |
| III.1. Nucléation primaire homogène  | 45        |
| III.2. Méthode de la double pulsion thermique (DPT)  | 45        |
| III.3. Energie interfaciale $\gamma$   | 47        |
| IV. Conclusion   | 47        |
| <b>Projets de recherche</b>  | <b>48</b> |
| I. Microfluidique pour solvants organiques   | 48        |
| II. Etudes multi-échelle   | 49        |
| III. Collaborations  | 49        |
| <i>Bibliographie du chapitre 3</i>   | 51        |
| <u>Publications</u> :  |           |
| - Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool                                |           |
| - Using microfluidics for fast accurate measurement of nucleation kinetics                                 |           |





## Préambule

De 1995 à 1998, j'ai réalisé mon travail de thèse sur l'Etude du mouillage forcé, dans le Laboratoire des Phénomènes de Transport dans les Mélanges (LPTM) à Meudon, unité propre de recherche du CNRS. Le projet intéressait la Société Rhodia qui cherchait à comprendre le mouillage de ses pulvérisations agrochimiques sur les végétaux. D'où une étude fondamentale des processus physico-chimiques influençant le mouillage d'une goutte après son impact sur une surface solide, c'est à dire en situation de mouillage forcé.<sup>1</sup> L'étude a porté sur des solutions tensioactives de cinétiques d'adsorption à l'interface liquide/air différentes et des émulsions pulvérisées sur une surface solide de faible énergie de surface. Au moment de l'impact, l'énergie cinétique permet d'étaler la goutte au-delà de son diamètre d'équilibre puis la goutte se rétracte différemment suivant les liquides.<sup>2</sup>

Avec les solutions tensioactives, l'étalement conduit à une telle dilatation de la surface de la goutte qu'elle est en total déséquilibre thermodynamique et la propriété de surface à mesurer est alors la tension dynamique.<sup>3</sup> En effet, la tension dynamique à l'interface liquide/air, obtenue pour une dilatation de surface correspondant à celle atteinte au diamètre maximum, devient le paramètre pertinent. Ainsi une expression simple du diamètre maximal atteint par la goutte en fonction des nombres de Reynolds et de Weber, des tensions statique et dynamique et de l'angle de contact dynamique, est établie.<sup>4</sup> De même, un coefficient d'étalement dynamique est défini, dont la valeur négative explique la rétraction de la goutte. Ce coefficient dépend du taux de dilatation de la surface et de la cinétique d'adsorption des tensioactifs à l'interface. Il existe deux modes de rétraction : un fort, pour les tensioactifs « lents » qui s'apparente à un démouillage inertiel avec croissance d'un bourrelet périphérique et formation d'ondes capillaires convergentes pouvant provoquer un rebond ; un faible, pour les tensioactifs « rapides » qui donne une relaxation exponentielle de la goutte. Enfin, l'énergie de surface du solide n'est pas modifiée par ces solutions jusqu'au diamètre maximal.<sup>5</sup>

Avec les émulsions, la rétraction n'est plus régie par la tension dynamique due à une concentration très élevée en tensioactif, mais par l'énergie de l'interface liquide/solide, laquelle est modifiée par l'adhésion et éventuellement la coalescence de paroi des gouttelettes d'huile. Seules les émulsions dispersées se rétractent selon une loi en  $t^{1/2}$ . Aux grands temps, la répartition de l'huile sur la surface solide peut être influencée par l'existence ou non d'une coalescence soit de paroi, soit des gouttelettes entre elles.<sup>6</sup> La méthode mise en place s'avère être applicable à tous les problèmes de traitement de surface par pulvérisation de fluides complexes (agrochimie, peinture, lubrification, ...). Ainsi, j'ai consacré un stage Post-Doctoral à

---

<sup>1</sup> de Gennes P.-G., Wetting: statics and dynamics, *Rev. Mod. Phys.*, 57, 827-863 (1985)

<sup>2</sup> Vignes-Adler M., Prunet-Foch B., Legay F., Mourougou N., A study of Impacting droplets of an emulsion or surfactant solution on solid substrates, *Dynamics in small confining system III*, (Eds J. Drake, J. Klafter, R. Kopelman), 464, 105-1147 (1997)

<sup>3</sup> Joos P., Rillaerts E., Theory of the determination of the dynamic surface tension with the drop volume and maximum bubble pressure methods, *J. Colloid Interface Sci.*, 79 (1), 96 (1981)

<sup>4</sup> Mourougou-Candoni N., Prunet-Foch B., Legay F., Vignes-Adler M., Wong K., Influence of dynamic surface tension on the spreading of surfactant solutions impacting onto a low surface-energy solid substrate, *J. Colloid Interface Sci.*, 192, 129-141 (1997)

<sup>5</sup> Mourougou-Candoni N., Prunet-Foch B., Legay F., Vignes-Adler M., Wong K., Retraction phenomena of surfactant solution drops upon impact on a solid substrate of low surface energy, *Langmuir*, 15, 19, 6563-6574 (1999)

<sup>6</sup> Mourougou-Candoni N., Etude du mouillage forcé, *Thèse*, Université Paris VI, (1998)

cette étude sur des liquides polymériques intéressant la Société Renault. Ces liquides se différencient par leurs propriétés de surfaces mais surtout par leurs propriétés rhéologiques. En effet, ils sont caractérisés par la viscosité dynamique de cisaillement et la reprise de structure lorsque le cisaillement est réduit. Le rôle prédominant des propriétés rhéologiques lors du mouillage forcé a alors été montré. Jusqu'à aujourd'hui, d'autres auteurs se sont intéressés au couplage de l'hydrodynamique de l'écrasement d'une goutte à ces effets physico-chimiques et à des forts déséquilibres thermodynamiques.<sup>7-8</sup>

En 2000, j'ai été recrutée sur un poste de Maître de Conférences dans le Groupe de Physique des Etats Condensés (GPEC, UMR CNRS 6631) et à l'Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Luminy (ESIL), à la suite d'un poste d'ATER au sein de ces composantes (1999). Après une thèse, sur des effets macro ou microscopiques aux interfaces, j'ai donc réalisé une reconversion thématique vers la détection d'objets biologiques nanoscopiques, notamment avec des techniques de champ proche. J'ai d'abord rejoint Franck Thibaudau dans le cadre de la création d'une nouvelle équipe orientée vers la détection de molécules biologiques (ADN, protéines). L'équipe « surfaces bio-fonctionnalisées » avait pour objectif l'immobilisation de molécules bio-actives pour la réalisation de bio-capteur, en collaboration avec des biologistes du Laboratoire Technological Advances for Genomics and Clinics (TAGC, INSERM U928).<sup>9</sup> Mon but a alors été de contrôler les mécanismes d'adsorption des molécules sur une surface et leur réactivité à une molécule biologique. Pour cela, j'ai suivi une formation en manipulation d'ARN messenger et de fragments d'ADN (rétrotranscription, marquage, ...) dans le laboratoire TAGC. L'ensemble du travail que je décris dans ce manuscrit a été réalisé avec la collaboration de Jean-Matthieu Barbier, étudiant M2-Recherche et de 3 Attachés Temporaire d'Enseignement et de Recherche qui n'étaient pas du domaine. Cette thématique s'est poursuivie lorsque le GPEC a fusionné avec le Centre de Recherche sur les Mécanismes de la Croissance Cristalline (CRMC2, UPR CNRS 7251) pour donner le Centre de Recherche en Matière Condensée et Nanosciences (CRMC-N, UPR CNRS 7251). Une troisième personne, Anne Charrier, a rejoint l'équipe sur un projet de détection par colorimétrie de la réactivité de nanoparticules fonctionnalisées avec de l'ADN, auquel j'ai également participé avec l'encadrement de Julien Boisse, étudiant M2-Recherche<sup>10-11</sup> (étude non présentée dans ce manuscrit).

Par la suite, le Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille (CINaM, UPR CNRS 3118) est né de la fusion du CRMC-N avec le Groupe de Chimie Organique et Matériaux Moléculaires (GCOM2, UMR CNRS 6114). A la création du CINaM, suite à la restructuration du laboratoire en départements, j'ai intégré le Département « Sources et Sondes Ponctuelles » dirigé par Roger Morin, pour poursuivre mes recherches sur les méthodes de détection directe de molécules ou d'objets individuels. Ce département compte 12 chercheurs et enseignant-chercheurs qui travaillent dans des domaines variés autour d'une thématique commune : la mise en évidence et la compréhension des phénomènes physiques, chimiques ou

---

<sup>7</sup> Crooks R., Cooper-White J., Boger D.V., The role of dynamic surface tension and elasticity on the dynamics of drop impact, *Chemical Engineering Science*, 56 (19), 5575-5592 (2001)

<sup>8</sup> Yarin A.L., Drop Impact Dynamics: Splashing, Spreading, Receding, Bouncing..., *Annual Review of Fluid Mechanics*, 38, 159-192 (2006)

<sup>9</sup> Bertucci F., Bernard K., Loriod B., Yi-Chung Chang, Granjeaud S., Birnbaum D., Nguyen C., Peck K. and Jordan BR. (1999) Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements: advantages of Nylon membranes. *Human Molecular Genetics*, vol. 8, N°9: 1715-1722

<sup>10</sup> Charrier A., Candoni N., Thibaudau F., A DNA Detection Method Based on the 2D Aggregation and Selective Desorption of Nanoparticle Probes, *J. Phys. Chem. B*, 110, 12896 (2006)

<sup>11</sup> Charrier A., Candoni N., Liachenko N., Thibaudau F., 2D aggregation and selective desorption of nanoparticles probes : A new method to probe DNA mismatches and damages, *Biosens. Bioelect.*, 22, issues 9-10, 1881-1886 (2007)

biologiques régissant les propriétés d'objets isolés étudiés un à un ou collectivement sous la forme d'assemblages. Le but est de mettre en avant le fait que ces objets ou ces assemblages, naturels ou artificiels, constituent autant de sources de particules et de signaux, que de sondes de propriétés originales. Ainsi la nucléation de phases dans une solution, l'effet de champ à l'apex d'une pointe, la photoémission à partir d'un contact électrique ponctuel ou par une molécule sont des processus associés à des sources. Réciproquement, l'étude des propriétés i.e. fréquences d'apparition, cohérences, localisations spatiales, spectres etc..., des cristaux, électrons, ions ou photons émis sont des sondes pertinentes de ces processus. Mes 2 activités de recherche, que je mène dans ce département, s'inscrivent complètement dans sa thématique.

Le premier projet, que j'ai débuté en 2007 en collaboration avec Philippe Dumas et Hubert Klein, s'intéresse à la caractérisation d'une molécule unique pour étudier ses propriétés physico-chimiques, de façon plus rigoureuse que des mesures moyennes sur une grande population de molécules. L'idée est alors de mesurer la conductance comme caractéristique physique. Pour cela, l'étape cruciale est donc la manipulation de la molécule grâce à des nano-pincettes qui, dans notre cas, sont aussi des nano-électrodes. Ces dernières sont contrôlées à travers deux systèmes que nous avons développés : le premier système crée une nano-jonction d'or entre une pointe et une surface, dont le contrôle est basé sur la technique du microscope à effet tunnel (STM-BJ) ; le second crée la nano-jonction en étirant un fil d'or contrôlé mécaniquement (MCBJ). Ma principale implication dans ces études a concerné le second système que j'ai développé avec la collaboration de Sabrina Homri, étudiante M2-Recherche, d'Ugo Baudez, étudiant IUT et de Thomas Léoni, étudiant en thèse. Ce dernier a travaillé sur les 2 systèmes complémentaires. Il a développé des outils d'analyses statistiques afin d'extraire des paramètres pertinents des mesures de conductance sur le STM-BJ et il a démontré l'isolement d'une molécule. Nous poursuivons actuellement le travail avec la MCBJ dans le cadre de la thèse de Monzer Alwan qui a débuté en octobre 2009. Le but est d'obtenir un système plus lent et moins sensible aux perturbations pour des études plus quantitatives sur la molécule unique.

Depuis 2009, je travaille également sur un projet d'étude de la nucléation d'un cristal unique dans un système microfluidique. L'idée est de dissocier la première étape de nucléation de celle de la croissance, donnant ainsi accès au contrôle de la nucléation. L'utilisation d'un système microfluidique permet de provoquer la cristallisation de manière localisée dans l'espace dans des gouttes de volume nanométrique où seul un cristal nucléé, et de former une population de gouttes identiques pour des études statistiques. L'objectif est le criblage des conditions de cristallisation (diagramme de phases, nucléation, polymorphisme,...) de protéines ou de principes actifs, notamment dans le domaine de la chimie pharmaceutique et de la biologie. Dans le cadre de ce projet, je collabore avec Stéphane Veessler avec qui je co-encadre Manuel Ildefonso, étudiant en thèse depuis septembre 2009. Enfin, pour cette thématique, j'ai suivi des formations en microfluidique (*Ecole de microfluidique, Les Houches*) et en cristallisation (*International School of Crystallization, Spain*).

Ce manuscrit comportera 3 chapitres présentant mes 3 principales activités de recherche depuis ma prise de fonction :

- Surfaces bio-fonctionnalisées pour le greffage et la détection de molécules uniques
- Contacts atomiques et moléculaires
- Nucléation d'un cristal unique dans un système microfluidique



# Chapitre 1

## Surfaces bio-fonctionnalisées

### Pour le greffage et la détection de molécules uniques

Dans ce premier chapitre, je décris les études fondamentales menées sur la fonctionnalisation de surface dans le but d'y greffer des molécules détectables individuellement par microscopie à force atomique (AFM). Pour cela, je me suis intéressée aux mécanismes d'adsorption de molécules (aminosilanes, oligonucléotides, alkylthiol, alcoolthiol) sur une surface solide afin de contrôler leur dispersion ou la formation d'assemblages de ces molécules (couches autoassemblées). L'observation par AFM des surfaces fonctionnalisées est complétée par des analyses de chimie de surface (angle de contact, XPS, AES). L'application concernant le problème de détection d'ADN, nous avons observé la réactivité d'une de nos surfaces fonctionnalisées à un ADN, en collaboration avec des biologistes du Laboratoire Technological Advances for Genomics and Clinics (TAGC, INSERM U928). Ce travail a été réalisé avec la participation de Jean-Matthieu Barbier, étudiant M2-Recherche ainsi que Cathy Naud, Isabelle Meunier et Olivier Guillermet, Attachés Temporaire d'Enseignement et de Recherche.

## Introduction

Dans ce projet, nous nous intéressons à l'immobilisation de molécules bio-actives sur une surface, pour une étude par imagerie AFM, dans le cadre d'une application dans le domaine des puces à ADN. Les puces à ADN servent à détecter et à quantifier la présence d'un ARN messager donné, dans une cellule. Pour cela, les puces à ADN présentent des milliers de plots de fragments d'ADN (oligonucléotides) de séquences connues, qui sont disposés en un réseau ordonné sur une surface. L'ARN messager à détecter est « recopié » (rétrotranscrit) en ADN qui est marqué par radioactivité, par fluorescence ou par des enzymes à révélation colorimétrique. Le fonctionnement des puces est alors basé sur l'hybridation de l'ADN marqué sur le plot qui contient l'oligonucléotide de séquence complémentaire. Le taux d'hybridation est mesuré sur chaque plot par la lecture du signal émis par l'ADN marqué. Cependant ces méthodes de lecture indirecte par marquage, nécessitent en général plus de 100000 molécules d'un ARN messager donné par plot, ce qui correspond à environ  $10^5$  cellules.<sup>1</sup> On peut amplifier la rétrotranscription de l'ARN messager en ADN afin de diminuer la quantité d'ARN nécessaire, mais cette amplification est susceptible d'introduire des biais de représentation pour certains ARN. Pour éviter les étapes d'amplification et de marquage, l'idéal est de détecter directement l'hybridation de l'ARN messager à l'échelle moléculaire. Une telle détection conduit à une réduction de la taille des plots vers l'échelle du micron et un accroissement du nombre de séquences analysées sur une même puce. Ceci rejoint alors la course à la miniaturisation des puces à ADN qui s'opère depuis quelques années, alors que les méthodes conventionnelles d'analyse (radioactivité, fluorescence, ...) ne sont pas appropriées. De plus, ces mesures étant macroscopiques, elles ne donnent pas d'informations locales sur la constitution des puces à cette échelle.

L'idée est alors d'utiliser le microscope à force atomique (AFM) pour discriminer les ADN hybridés des oligonucléotides. En effet, l'AFM est un outil de choix qui permet de visualiser la structure des surfaces solides<sup>2</sup> et d'obtenir des images de molécules sur ces surfaces avec une résolution moléculaire, dans des milieux variés (air, liquide, vide). Ainsi, d'abord utilisé par les physiciens des surfaces, l'AFM a rapidement trouvé un intérêt parmi les biologistes pour l'imagerie d'objets biologiques. Par exemple, l'ADN déposé sur du graphite ou du mica est l'un des premiers objets biologiques qui a donné des images par AFM.<sup>3</sup> Ces auteurs utilisent des surfaces avec des zones très peu rugueuses car la lecture par AFM impose cette contrainte sur l'état de la surface. Ainsi, le graphite ou le mica sont adaptés pour déposer l'ADN couché sur la surface et en étudier la structure par AFM. Dans notre cas, l'oligonucléotide doit se greffer sur la surface mais il doit aussi être disponible pour l'hybridation, car le but est d'imager individuellement les phénomènes d'hybridation. Les substrats souvent utilisés sont alors des surfaces de Si/SiO<sub>2</sub>,<sup>4-6</sup> d'Au<sup>7-13</sup> ou de mica.<sup>14-15</sup> Sur la surface d'Au, un oligonucléotide thiolé est greffé directement par une liaison S-Au. Sur les surfaces de Si/SiO<sub>2</sub> et de mica, une ou plusieurs couches « d'attache » doivent d'abord être adsorbées de façon homogène, et être réactives aux oligonucléotides. Toutefois dans ce cas, l'oligonucléotide doit se lier par une liaison S-C qui est plus forte que la liaison S-Au.

Les étapes de fonctionnalisation de la surface sont donc cruciales dans notre projet. Ainsi, notre étude porte surtout sur la compréhension des mécanismes d'adsorption des différentes molécules. Pour cela, nous combinons la résolution moléculaire de l'AFM aux analyses chimiques par Spectroscopie de photoélectron X ou par Spectroscopie d'Electrons Auger et aux mesures d'angles de contact. Nous choisissons une surface de mica et une surface d'Au qui subissent des traitements distincts :

- **La partie 1** est consacrée au mica, qui est adapté à la visualisation par AFM car en clivant le feuillet supérieur, on obtient une surface propre présentant des terrasses atomiquement planes.<sup>16-21</sup> Sur cette surface, l'objectif est de former une couche autoassemblée d'aminosilanes qui pourra permettre le greffage d'oligonucléotides. L'analyse de la fonctionnalisation par l'aminosilane étant en général décrite par des propriétés moyennes sur la surface,<sup>6</sup> nous explorons ici les conditions de dépôt de l'aminosilane par AFM pour en étudier la structure.

- **La partie 2** concerne la surface d'Au(111) qui donne également des terrasses atomiquement planes, obtenues par évaporation d'Au sur une surface de mica suivant une méthode développée au laboratoire.<sup>22</sup> L'oligonucléotide, thiolé à une de ses extrémités, se lie alors directement à la surface d'or par une liaison S-Au.<sup>7-10</sup> Notre étude permet de comprendre les mécanismes d'adsorption des oligonucléotides en solution.

- **La partie 3** décrit les expériences d'hybridation sur la surface d'Au(111) fonctionnalisée car on peut y contrôler la disponibilité des oligonucléotides. Ainsi, nous montrons qu'il est possible d'y discriminer les ADN hybridés des oligonucléotides par imagerie AFM.

## **Partie 1. Fonctionnalisation d'une surface de mica par un aminosilane**

Les aminosilanes sont présentés comme se greffant sur le mica par des liaisons covalentes Si-O entre les molécules et/ou avec les groupes hydroxyles de la surface dus aux groupements alkoxyasilane de l'aminosilane. Ils sont alors censés former un film 2D homogène, ce qui nous intéresse pour y greffer des oligonucléotides et imager en AFM. Cependant, les groupements terminaux sont capables d'interagir avec la surface à travers des liaisons hydrogènes ou des interactions électrostatiques donnant différentes configurations de la molécule sur la surface. De plus, comme les interactions entre les molécules et la surface dépendent des conditions expérimentales et des propriétés du substrat, la formation du film est souvent peu reproductible.

Nous nous intéressons à l'AAPS ou (N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane) qui a été étudié en phase liquide sur du Si/SiO<sub>2</sub>.<sup>6, 23</sup> Nous pouvons considérer que la surface de mica se rapproche en composition de la surface du Si/SiO<sub>2</sub>. Cependant, aucune expérience confirmant la monocouche homogène d'AAPS n'a été reportée sur le mica. De plus le mica présente en solution, une grande densité de charges de surface négatives donnant des interactions électrostatiques possibles avec les groupements d'amines protonées de l'AAPS.<sup>24</sup> Nous explorons alors l'adsorption en phase aqueuse comme celle en phase gazeuse. L'analyse est possible en croisant les résultats de Spectroscopie de photoélectron X (XPS), l'imagerie de la surface en résolution nanoscopique en AFM et les mesures d'angles de contact<sup>25</sup> (décrits dans l'article à la fin de ce chapitre).

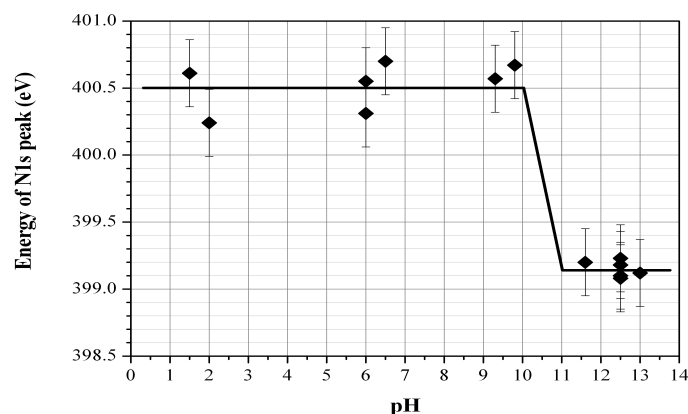
### **I. Adsorption en phase aqueuse**

#### **I.1. Rôle du pH en phase aqueuse**

En phase aqueuse, les deux amines de la molécule d'AAPS peuvent chacune se protoner ou pas, suivant le pH. L'arrangement cristallin du mica comprend des sites négatifs associés aux atomes d'Aluminium et comblés par des ions potassium K<sup>+</sup>. En solution, ces cations (K<sup>+</sup>) peuvent être extraits ou remplacés ce qui conduit à un potentiel de surface négatif.<sup>20</sup> Par exemple, les molécules d'AAPS protonées (dus au pH) peuvent remplacer les ions K<sup>+</sup> et ainsi s'adsorber préférentiellement sur la surface. Par conséquent, le pH joue un rôle décisif dans l'adsorption de l'AAPS sur la surface de mica.

L'XPS est alors un outil de choix pour analyser le niveau de protonation des molécules en se concentrant sur le pic N1s de l'amine. En effet, lorsque la surface est couverte par moins de la moitié de la monocouche compacte, deux énergies de liaison du N1s se distinguent (figure 1) : l'une autour de 399,2eV pour des pH supérieurs à 11, correspond aux molécules d'AAPS avec les amines neutres ;<sup>26</sup> la seconde énergie est autour de 400,5eV pour des pH inférieurs à 10, valeur d'énergie à mi-chemin entre celle des deux amines neutres et celle d'une des deux amines protonée (401.3eV<sup>26</sup>). Par conséquent cette énergie est clairement liée à la protonation d'une des deux amines.



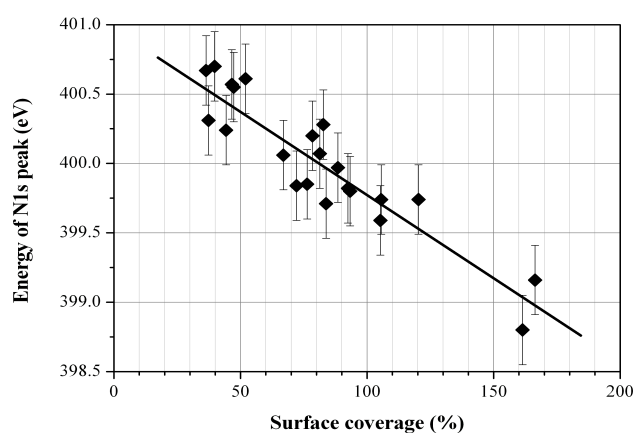


**Figure 1.** Energie du pic N1s en fonction du pH de la solution d'AAPS pour des taux de couverture de la surface faible. Le rapport des intensités des pics d'azote de l'AAPS et de l'aluminium du mica  $I_N/I_{Al}$ , donnant la quantité de molécules adsorbées, est inférieur à 0,7 (la monocouche compacte correspond à  $I_N/I_{Al}$  de 1,3).<sup>25</sup> Aux pH supérieurs à 11, les molécules d'AAPS adsorbées présentent des amines neutres. Aux pH inférieurs à 10, une des deux amines est protonée (la valeur de l'énergie est à mi-chemin entre celle des deux amines neutres et celle d'une des deux amines protonée).

## I.2. Interactions des molécules avec la surface

Ce comportement de la couche d'AAPS sur la surface de mica dépendant du pH est typique d'une base faible. Aussi ces résultats peuvent être comparés au  $pK_{1/2}$  introduit par Holmes-Farley et al.<sup>27</sup> Ils définissent le  $pK_{1/2}$  pour une interface solide/liquide comme la valeur de pH de la solution à laquelle les groupes fonctionnels sont à moitié ionisés. Dans notre cas, le  $pK_{1/2}$  du film est dans la gamme de 10-11. Cette valeur de pKa étant proche de celle de l'amine terminale de l'AAPS, i.e. 10.2 (le pKa de l'amine secondaire est de 8.5),<sup>16, 28</sup> c'est donc cette amine qui apparaît protonée aux pH inférieurs à 10.

Pour ces faibles pH, le taux de couverture de la surface varie d'un demi à une fois et demi la monocouche compacte alors que l'énergie du pic N1s décroît de 400,5eV to 399eV (figure 2). Par conséquent, la composition des AAPS adsorbées varie, de molécules avec une amine terminale protonée (400,5eV) à, de plus en plus de molécules avec les deux amines neutres (399eV).



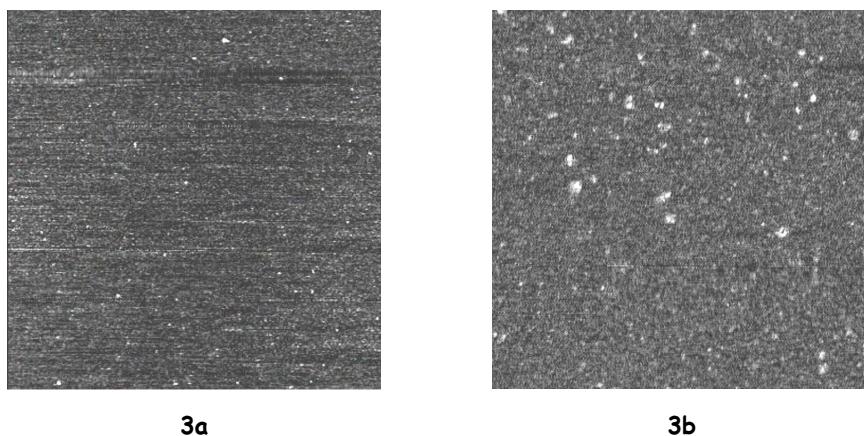
**Figure 2.** Energie du pic N1s en fonction du taux de couverture de la surface de mica par l'AAPS pour des  $pH < 10$ . Le taux de couverture est représenté par un pourcentage de la monocouche compacte.<sup>25</sup> Les molécules présentant leur amine terminale protonée s'adsorbent d'abord, suivies des molécules avec les deux amines neutres.

De plus la densité de surface maximale atteinte par les molécules d'AAPS protonées est autour de 40% de la monocouche compacte (figure 2). Nous relierons alors la densité d'AAPS protonées (i.e.  $1,7 \cdot 10^{14}$  molécules.cm<sup>-2</sup>) à la densité de charges négatives sur la surface nue de mica qui est de l'ordre de  $1,8 \cdot 10^{14}$ cm<sup>-2</sup>.<sup>29</sup> Ainsi il est clair que l'adsorption procède d'abord par des interactions ioniques entre les amines protonées et les charges négatives de la surface jusqu'à ce que celles-ci soient neutralisées. Puis, des répulsions électrostatiques entre les molécules d'AAPS protonées inhibent leur adsorption supplémentaire ce qui permet aux molécules neutres de s'adsorber sur la surface.

Pour des pH élevés, le comportement est tout à fait différent car la concentration des solutions doit être plus élevée pour obtenir une adsorption significative des molécules sur la surface. En fait, aucune des amines n'est alors protonée (pKa of 8.5 and 10.2<sup>28</sup>) et les charges de la surface de mica sont compensées par d'autres cations de la solution (K<sup>+</sup>). Par conséquent, les interactions de la surface d'AAPS avec la surface ne sont plus électrostatiques par rapport aux pH inférieurs à 10

### I.3. Configuration des molécules sur la surface

Pour toutes les concentrations en AAPS expérimentées (40μM, 400μM and 4mM), le taux de couverture des molécules croît rapidement avec le temps d'incubation puis sature proche de la moitié de la monocouche compacte. A ce moment, les molécules sont encore couchées sur le substrat (figure 3a). On pourrait alors s'attendre à ce que le taux de couverture augmente et que les molécules se redressent progressivement pour former une monocouche assemblée, dont la cohésion serait assurée par des interactions attractives intermoléculaires de type Van der Waals. Cependant on observe plutôt l'adsorption d'agrégats de molécules (figure 3b), déjà formés dans la solution due à leur copolymérisation, comme cela a déjà été décrit pour d'autres aminosilanes.<sup>23, 30-31</sup>



**Figures 3.** Images AFM de  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ , échelle z 1nm, de surfaces de mica hydratées incubées dans une solution d'AAPS à 40μM :<sup>25</sup>

**3a)** pendant 5min : surface homogène avec une faible rugosité de l'ordre de quelques Å ; aucun îlot ou aucune structure de 1nm de haut correspondant à la longueur des AAPS ne sont observés. Les molécules sont donc couchées sur la surface.

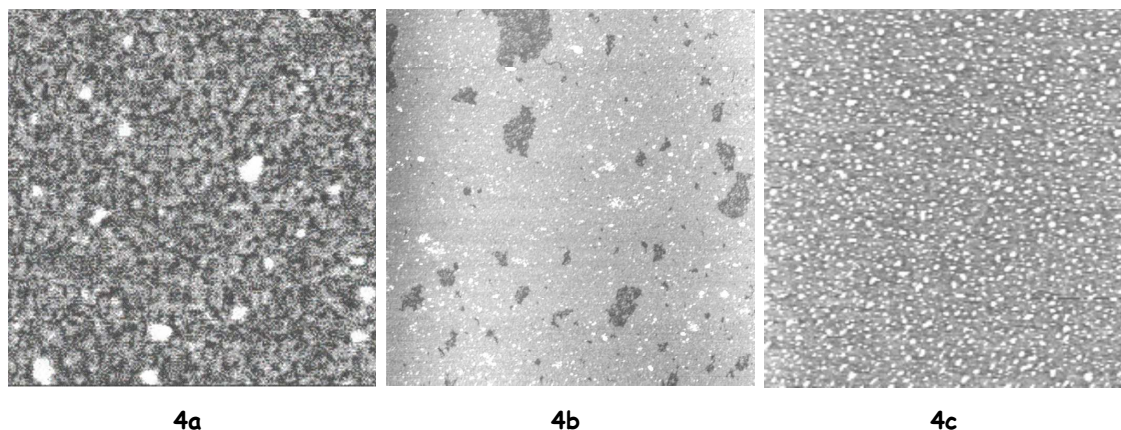
**3b)** pendant 45min : des protubérances de hauteurs hétérogènes autour de 0,3-1nm apparaissent sur la première couche. Elles correspondent à des agrégats de molécules déjà formées dans la solution.

En conclusion, l'étude de l'adsorption de l'AAPS en phase liquide montre une dépendance avec le pH très intéressante d'un point de vue fondamental.<sup>25</sup> Toutefois, le désordre du film sur la surface et la copolymérisation des molécules d'AAPS en solution limitent l'efficacité du greffage des oligonucléotides. Une solution pour remédier à ces problèmes est alors d'absorber l'AAPS en phase vapeur.

## II. Adsorption de l'AAPS en phase vapeur

### II.1. Structure du film d'AAPS sur la surface

L'avantage de l'adsorption de l'AAPS en phase vapeur, est la faible densité de molécules qui doit permettre d'éviter leur co-polymérisation. Ainsi, des monocouches auto-assemblées ont été obtenues sur du Si/SiO<sub>2</sub> avec du silane déposé en phase vapeur.<sup>32</sup> La surface de mica est préalablement hydratée pour la rendre réactive à l'AAPS comme le Si/SiO<sub>2</sub>.<sup>25</sup> En effet, des phases condensées de molécules (0,8 nm) entourées de molécules plus ou moins couchées sur la surface (0,4-0,5nm) s'étendent en une monocouche de molécules redressées (taille de la molécule de 1nm) (figures 4a et 4b). Ceci est confirmé par l'angle de contact de 50° obtenu sur le film qui est dans la gamme des angles reportés pour les SAMs d'aminosilanes (40°-63°).<sup>33</sup> Les molécules ont donc tendance à d'abord s'adsorber sur la surface en une phase désordonnée puis à condenser en îlots qui croissent et coalescent pour former la monocouche. Au-dessus de ce film, les molécules s'adsorbent plutôt en formant des clusters 3D (figure 4c). Ce phénomène est similaire à celui rencontré dans le mode de croissance cristalline de Stransky-Krastanov. Ce mode apparaît lorsque l'énergie interfaciale entre la surface et la première monocouche est plus faible que l'énergie de surface de la monocouche, et lorsque l'énergie interfaciale entre la première monocouche et les couches successives est plus élevée que l'énergie de surface de ces couches successives.



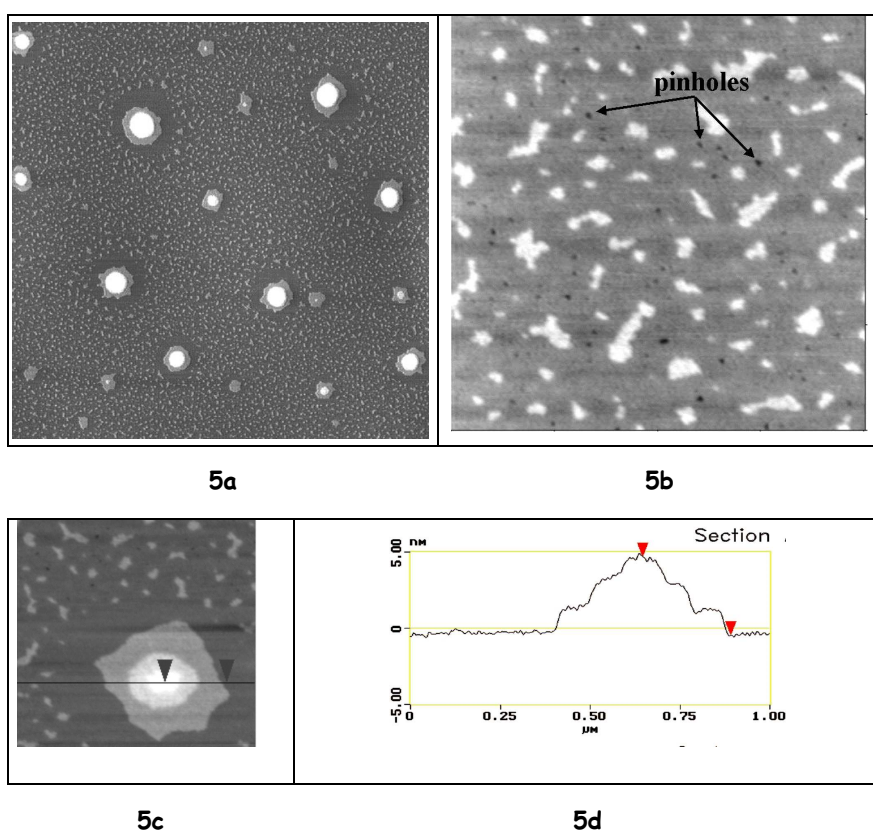
**Figures 4.** Images AFM de surfaces de mica hydratées exposées à la vapeur d'AAPS sous atmosphère azotée à température ambiante :<sup>25</sup>

**4a)** pendant 15 min : Images AFM de  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , échelle z 1 nm, montrant des îlots bidimensionnels de 0,8 nm de hauteur entourés d'une surface rugueuse de 0,4-0,5 nm. Des phases condensées de molécules sont entourées de molécules plus ou moins couchées sur la surface.

**4b)** pendant 1 h : Images AFM de  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ , échelle z 1 nm, montrant un film homogène avec des trous de 0,8 nm de profondeur (et quelques protubérances).

**4c)** pendant 48 h : Images AFM de  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ , échelle z 10 nm, montrant une surface plus rugueuse avec des protubérances de 2 à 4 nm de haut. Au-dessus de la première monocouche, les molécules s'adsorbent en formant des clusters 3D

Par ailleurs, nous observons que les molécules au dessus de la première monocouche sont mobiles dues à une polymérisation incomplète après l'exposition à l'AAPS sous atmosphère azotée (figure 4c). Ceci est certainement dû à l'absence de molécules d'eau nécessaires à l'hydrolyse des groupements terminaux methoxy. Alors qu'en atmosphère ambiante, elles se réorganisent et l'humidité ambiante permet leur hydrolyse déclenchant la polymérisation et la restructuration du film (figure 5a). En effet, des îlots bi-dimensionnels de 1,7nm se forment alors et croissent à partir de la matière environnante créant une zone de déplétion autour des plus hauts îlots. Ces derniers sont formés d'un empilement de couches bi-dimensionnelles de 1,7nm de haut (profil figure 5d) qui montre un ordre perpendiculaire à la surface dans le film, au-dessus de la première monocouche.



**Figures 5.** Images AFM d'une surface de mica hydratée exposée à la vapeur d'AAPS sous atmosphère azotée pendant 48h, puis exposée sous atmosphère ambiante pendant 24h:<sup>25</sup>

**5a)** Images AFM de 10x10 μm<sup>2</sup>, échelle z 15nm, montrant des petits îlots bi-dimensionnels de 1,7nm de haut et quelques îlots plus larges, entourés d'une zone de déplétion.

**5b)** Images AFM de 1x1 μm<sup>2</sup>, échelle z 3nm, montrant des îlots bidimensionnels de 1,7nm et des trous de 0,8nm de profondeur dans le film supportant les îlots.

**5c)** Images AFM de 1x1 μm<sup>2</sup>, échelle z 5nm, montrant un large îlot bidimensionnel composé de 3 couches superposées de 1,7nm.

**5d)** Analyse du profil de l'îlot de la figure 5c.

## II.2. Configuration des molécules sur la surface

La première monocouche, donnant un angle de contact de  $50^\circ$  comparable à celui attendu pour une monocouche présentant 100% d'amines (approximativement  $60^\circ$ ),<sup>34</sup> est formée de molécules s'assemblant, uniformément redressées sur la surface avec les groupements terminaux amines orientés majoritairement au dessus de la surface. De plus les molécules interagissent entre elles ou avec la surface lors de l'adsorption en atmosphère azotée ce qui rend la monocouche stable lorsqu'elle est exposée sous atmosphère ambiante (figure 5b). Cependant, les liaisons covalentes Si-O avec la surface ont peu de chance de se former en atmosphère azotée dû à l'absence de molécules d'eau pour hydrolyser les groupements méthoxy. Par conséquent, la cohésion de la monocouche doit être assurée par des interactions attractives intermoléculaires comme celles de Van der Waals.

Au dessus de la première monocouche, la restructuration du film sous atmosphère ambiante forme des morceaux de bi-couches de molécules redressées dont la configuration est déduite de la périodicité des couches et des interactions (amine ou méthoxy) à leur interface et à l'interface avec l'air. Des considérations de densité de couche, de mécanisme de polymérisation et de différences d'énergies interfaciales permettent même de suggérer une structure en « simple feuillet » à l'intérieur des bi-couches.<sup>25</sup>

## III. Conclusion sur le système AAPS/mica

Dans cette partie, je décris le travail mené sur le traitement du mica par l'AAPS, à travers des observations par AFM, des mesures d'angles de contact et des analyses chimiques par XPS. Le but est de mieux comprendre la formation et la structure de la fonctionnalisation. Concernant le traitement en phase aqueuse, l'interaction des molécules avec la surface dépend fortement du pH.<sup>25</sup> Cette étude a permis de caractériser l'interface AAPS/mica par son  $pK_{a1/2}$  évalué à 10-11. Ainsi, les molécules s'adsorbent sur la surface via leur terminaison amine protonée, seulement aux pH inférieurs à 10. Dans le cas de l'adsorption en phase vapeur, un film structuré d'AAPS se forme sur la surface de mica, constituée d'une première monocouche et de bi-couches successives. A notre connaissance, c'est la première observation d'une telle organisation du film d'aminosilane sur le mica. Grâce à la fonction amine présente à l'extrémité disponible de l'aminosilane, l'objectif est de greffer un oligonucléotide par l'intermédiaire d'un cross-linker. Cependant, l'étape de cross-linking s'avère être peu efficace comparée aux études menées sur les surfaces « désordonnées » obtenues en solution.<sup>6</sup> En fait, les silanes trifonctionnels comme l'AAPS permettent l'ancrage du siloxane avec un groupement silanol de la surface du substrat, mais ils interagissent également entre eux latéralement. Dans le cas des couches denses que nous observons, il semble que malgré une forte cohésion latérale, les molécules de silanes soient peu ancrées à la surface. Un moyen d'y remédier est de choisir un silane monofonctionnel comme cela a été étudié par la suite.<sup>35</sup>

L'utilisation du mica, comme surface pour l'observation de l'hybridation, nécessite plusieurs étapes de fonctionnalisation (aminosilanes, cross-linkers, oligonucléotides). Le greffage final des oligonucléotides est donc souvent peu reproductible car il dépend du rendement de chacune de ces étapes. Une solution est alors d'utiliser une surface sur laquelle l'oligonucléotide se greffe directement, telle que l'Au.

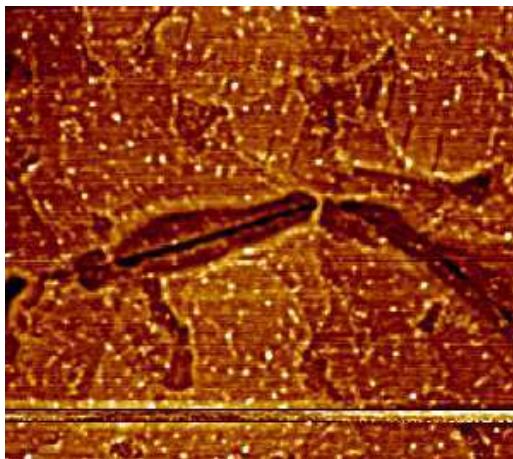


## Partie 2. Fonctionnalisation d'une surface d'or par un oligonucléotide

### **I. Adsorption : Physisorption ou chimisorption?**

Un oligonucléotide (fragment d'ADN) thiolé à une de ses extrémités peut s'adsorber sur une surface d'or de façon spécifique, c'est-à-dire en formant une liaison covalente. En effet, les thiols et les disulfides sont connus pour se lier fortement à l'or par une liaison S-Au. Nous travaillons donc avec des oligonucléotides de 25 bases thiolés par l'extrémité 5' à l'aide de  $\text{SH}(\text{CH}_2)_6$ . Cependant les oligonucléotides peuvent également se physisorber grâce à des interactions faibles N-Au dues aux azotes des chaînes de nucléotides. Ces interactions sont en général évitées car, d'une part les molécules peuvent facilement désorber, d'autre part elles sont peu accessibles à une future hybridation.

Grâce à l'AFM, la physisorption (avec des molécules non thiolées) est distinguée de la chimisorption des molécules alors que c'est impossible avec des techniques d'analyse chimique comme la Spectroscopie d'Electrons Auger (AES).<sup>36</sup> En effet, l'observation à l'AFM permet de distinguer les oligonucléotides thiolés alors que ceux non thiolés ne sont pas visibles. Ceci est dû à leur diffusion sur la surface qui est plus rapide que la vitesse de balayage de l'AFM. Ainsi, les oligonucléotides thiolés greffés sur une surface d'Au(111) apparaissent à l'AFM comme des protusions de taille nanométrique (figure 6). La longueur d'une molécule étirée étant de 16nm,<sup>7</sup> les oligonucléotides sont donc plutôt en conformation globulaire présentant des segments isotopiquement distribués dans l'espace et un rayon de giration dans la direction perpendiculaire à la surface de l'ordre de  $R_{gz} \approx 1.1 \pm 0.1 \text{ nm}$ .<sup>9</sup>



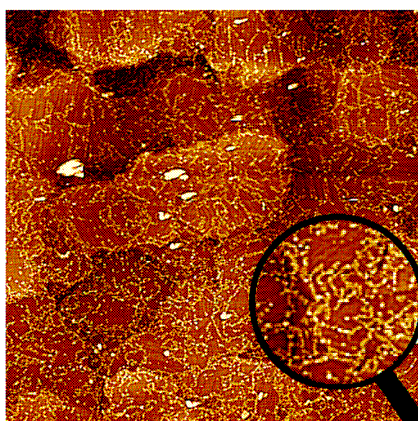
**Figure 6** Images AFM de  $0,6 \times 0,6 \mu\text{m}^2$ , échelle z 3nm, d'une surface d'Au incubée dans une solution d'oligonucléotide (5nM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M, pH 6,7) pendant quelques secondes. Les molécules apparaissent comme des protusions de  $\sim 1\text{nm}$  de haut et de  $\sim 15 \text{ nm}$  de large. La largeur de 15nm de ces objets n'est pas significative car elle est due à la résolution latérale de l'AFM qui est limitée par le diamètre de l'apex de la pointe de  $\sim 15\text{nm}$ .<sup>36</sup>

## II. Mécanisme de l'adsorption

L'adsorption des oligonucléotides sur la surface d'Au(111) suit un mécanisme en deux étapes.

### II.1. Première étape d'adsorption

La première étape de l'adsorption est une étape rapide avec une adsorption moyenne de  $5 \times 10^{10}$  à  $5 \times 10^{11}$  molécules/cm<sup>2</sup> (comptées sur les images AFM<sup>36</sup>). Au moment de l'incubation, certaines molécules atteignent la surface par diffusion dans la solution avec un coefficient de diffusion de  $6-7 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>,<sup>37</sup> ce qui conduit à une densité de surface inférieure à  $10^{10}$  molécules/cm<sup>2</sup>. En fait, l'étape rapide correspond aux molécules au contact avec la surface lors de l'immersion dans la solution. Comme elles n'ont pas le temps de réagir avec la surface, elles passent par un état précurseur physisorbé, pouvant aussi désorber, jusqu'à atteindre une densité d'équilibre. De plus, les premières molécules physisorbées diffusent et réagissent en formant des lignes que l'on peut parfois corrélérer à la cristallographie de la surface Au(111) et/ou à la présence de marche atomique (figure 7). Cette chimisorption se fait donc préférentiellement sur des structures de la surface, la densité des sites d'adsorption ou sites « actifs » pouvant varier fortement avec la préparation du substrat d'Au, d'où la grande variabilité de densité. Enfin, cette activité est reliée à la présence de zones reconstruites plus ou moins étendues, cette reconstruction étant connue pour être peu stable à l'air.



**Figure 7.** Image AFM de  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ , échelle z 3nm, de l'adsorption des oligonucléotides (5nM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M) sur la surface d'Au : Les molécules forment des lignes suivant la cristallographie de l'Au(111) (zoom). Elles semblent connectées entre elles dû à leur alignement compact et à la résolution latérale de l'AFM.<sup>35</sup>

### II.2. Seconde étape d'adsorption

Au cours de la seconde étape, le reste des molécules physisorbées se chimisorbent progressivement ce qui donne un taux de couverture qui croît lentement avec une vitesse de  $10^8$  molécules.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (calculée à partir des images AFM<sup>36</sup>). Le facteur cinétique donné par le rapport entre cette vitesse de croissance du taux de couverture et le taux de couverture à l'origine de la seconde étape (moyenne de  $2.5 \times 10^{11}$  molécules.cm<sup>-2</sup>) est de  $4 \times 10^{-4}$  s<sup>-1</sup>. Ce facteur cinétique est cohérent avec celui mesuré par Lavrich et al. pour la chimisorption d'alkanethiols sur une surface d'Au.<sup>38</sup> En considérant que ce facteur est proche de  $(10^{13}-10^{14}) \times e^{-E/RT}$  s<sup>-1</sup>, nous obtenons une énergie d'activation E de l'ordre de 100 kJ/mol. Cette valeur est dans la gamme des énergies d'activation de la dissociation d'une molécule de surface. Elle correspond alors à l'énergie d'activation de la réaction du groupement thiol avec l'Au.

### **II.3. Effet limitant : répulsion électrostatique ou facteur cinétique ?**

Dans le mécanisme en deux étapes, la densité des molécules chimisorbées est proportionnelle à la densité d'équilibre des molécules physisorbées. Ainsi, lors d'une incubation dans l'eau à température ambiante, la physisorption étant limitée par la répulsion électrostatique entre les oligonucléotides voisins due à la charge négative de leur colonne phosphatée, elle induit une faible chimisorption. Celle-ci peut donc être accrue, en favorisant la physisorption. En effet, on minimise la répulsion par des conditions d'adsorption à forte force ionique qui permettent d'écranter les charges des oligonucléotides, telle qu'une solution de phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M. Cependant, nous observons que la chimisorption croît aussi dans l'eau à haute température (60°C). La répulsion électrostatique, décrit comme phénomène limitant par Herne et al.,<sup>8</sup> est alors insuffisante. En effet, nous attribuons la forte chimisorption au facteur cinétique de réaction qui croît d'un rapport 10 à 60°C par rapport à la température ambiante.

### **III. Conclusion sur le système oligonucléotides/Au**

Dans cette partie, je décris l'étude menée sur l'adsorption en solution de l'oligonucléotide sur une surface d'Au caractérisée par de l'imagerie AFM et des analyses chimiques par AES. Comparée à l'AES qui détecte toutes les molécules présentes sur la surface, l'AFM permet de différencier physisorption et chimisorption et de compter les molécules chimisorbées. Ces dernières apparaissent comme des boules de ~1nm de haut qui peuvent être comptées sur la surface d'or et dont j'étudie le comportement lors de l'adsorption. La cinétique procède par un mécanisme en deux étapes : une première adsorption instantanée concerne essentiellement les molécules physisorbées lors de l'immersion de la surface dans la solution, jusqu'à une densité d'équilibre. Leur réaction avec l'Au se fait alors préférentiellement sur les marches et/ou les reconstructions de surface. Au cours de la seconde étape, les molécules diffusent et se chimisorbent sur la surface suivant sa structure avec un facteur cinétique dépendant de la température.

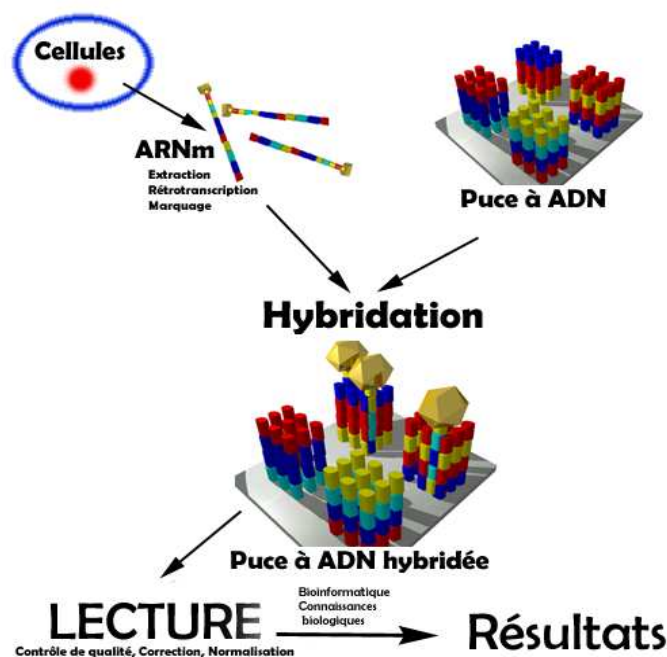
A travers cette étude, nous obtenons donc des surfaces fonctionnalisées avec des oligonucléotides chimisorbés que nous distinguons par AFM. Nous pouvons alors utiliser ces surfaces pour hybrider un ADN et comparer un oligonucléotide non hybridé, d'un autre hybridé à un ADN par AFM.



### Partie 3. Détection de l'hybridation par AFM

Une application potentielle de nos surfaces d'Au fonctionnalisées avec des oligonucléotides est leur utilisation comme puce à ADN, avec une lecture directe par imagerie AFM. Une puce à ADN permet de quantifier l'expression génique d'un système (cellule, tissu, organisme entier) par une identification qualitative et quantitative des ARN messagers (ARNm) présents dans la cellule. En fait, l'ARNm est une partie du gène codant qui est créé pour commander la production d'une protéine dans les ribosomes (en dehors du noyau). Suivant le type de cellule ou l'environnement, certains gènes s'expriment, alors que d'autres restent muets. Il est alors capital de pouvoir étudier quantitativement cette expression génique.

Le fonctionnement d'une quantification avec une puce à ADN est décrit sur la figure 8. L'ARNm est d'abord extrait de la cellule. Puis il est « recopié » (rétrotranscrit) en un ADN qui est marqué par radioactivité ou par fluorescence. La puce à ADN contient des milliers de plots qui sont disposés en un réseau ordonné sur la surface. Chaque plot comprend des millions d'oligonucléotides de même séquence connue. Lorsque la puce est mise en présence de l'ADN marqué, celui-ci va s'hybrider sur le plot contenant les oligonucléotides qui présentent une séquence complémentaire à la sienne. La mesure du signal émis par les plots permet alors de quantifier l'ADN, et donc l'ARNm.



**Figure 8.** Principe de fonctionnement d'une puce à ADN : La puce à ADN contient des milliers de plots disposés en un réseau ordonné sur la surface. Chaque plot comprend des millions d'oligonucléotides de même séquence connue (de 20 à 80 bases). L'ARNm à quantifier est extrait de la cellule et rétrotranscrit en un ADN, qui est marqué par radioactivité ou par fluorescence. Lorsque la puce est mise en présence de l'ADN marqué, celui-ci s'hybride sur le plot contenant les oligonucléotides présentant des complémentarités et y reste fixé. La quantité d'ADN est déduite de la mesure du niveau de fluorescence ou de radioactivité du plot correspondant à sa séquence.

Des développements dans le domaine des puces à ADN concernent l'augmentation du nombre de séquences à analyser à travers l'augmentation du nombre de plots. La tendance est alors à la réduction de la taille des plots vers le micron. Cependant cette miniaturisation introduit des problèmes de sensibilité de la méthode de lecture car la réduction de la taille des plots va diminuer la quantité de matière hybridée sur chacun d'eux. En effet, les méthodes classiques de détection par radioactivité ou par fluorescence ne permettent pas de détecter moins de 100000 molécules d'un ARNm donné par plot.<sup>1</sup> L'amplification de l'ADN lors de la rétrotranscription permet de diminuer la quantité d'ARN nécessaire, mais cette amplification est susceptible d'introduire des biais de représentation pour certains ARN. D'où l'idée d'utiliser la résolution moléculaire de l'AFM pour observer directement l'hybridation à l'échelle de ces nouveaux plots (de taille micronique).

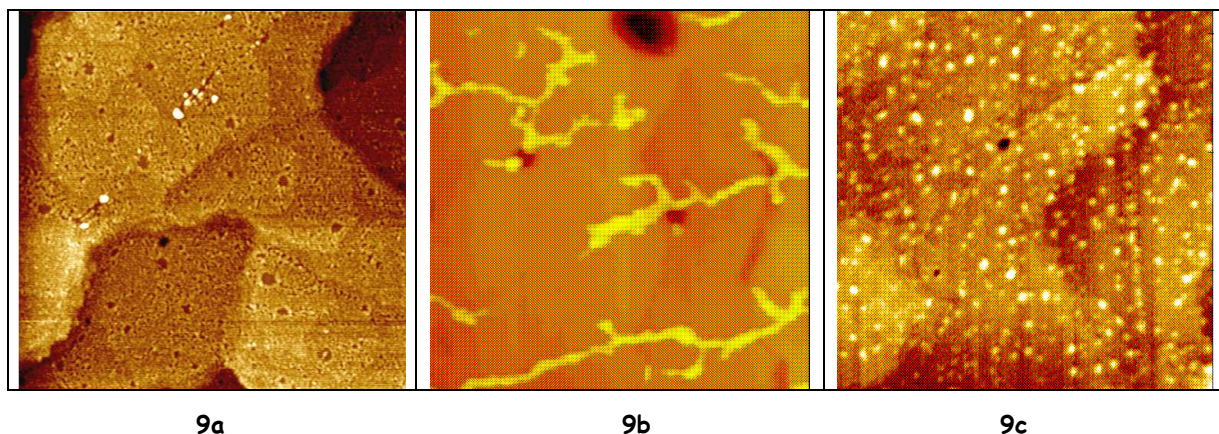
Pour cela, la surface fonctionnalisée doit présenter des oligonulcéotides disponibles pour l'hybridation et résistants aux bains d'hybridation. Ils doivent donc être greffés chimiquement sur la surface, en évitant toute molécule physisorbée par des méthodes de passivation de la surface oligonulcéotides/Au.

### **I. Passivation de la surface oligonucléotides/Au**

La passivation de la surface oligonucléotides/Au est conduite par l'intermédiaire de diverses molécules thiolées (mercaptohexanol (MCH) ou alkylthiols) qui entrent en compétition avec les oligonucléotides physisorbés :

- Les alkylthiols sont connus pour former des couches auto-assemblées sur l'Au. La formation de la monocouche procède en plusieurs étapes : la physisorption puis la diffusion et la chimisorption qui va conduire à une couche ordonnée par le biais des interactions attractives intermoléculaires. Le bilan net de ces différentes interactions fait que le processus d'adsorption d'un alkylthiol sur une surface d'Au est légèrement exothermique ( $\Delta E_{ads}$  0,2eV)<sup>39</sup> et spontané. Sur la surface saturée en oligonucléotides (figure 9a), un film homogène d'alkylthiols se forme et les oligonucléotides ont tendance à se « compacter » suivant des lignes (figure 9b). Cette tendance à la démixion est due au caractère hydrophobe des alkylthiols (le caractère hydrophobe croît avec la taille) qui « repoussent » les oligonucléotides sur les joints de grain. Ces derniers sont plus ou moins redressés sur la surface (hauteur de plusieurs nm). Cependant, cette passivation avec une molécule hydrophobe rend les oligonulcéotides peu disponibles à l'hybridation.

- La passivation avec une molécule hydrophile telle le mercaptohexanol (chaîne alkyl de six carbones avec un thiol et une fonction alcool à ses extrémités) désorbe la quasi-totalité des molécules (90%) chimisorbées, et les substitue par un film moléculaire (figure 9c). Ce résultat diffère notablement de celui obtenu par Herne et al.<sup>8</sup> (20 à 50 % de désorption), qu'ils attribuent à l'unique désorption des oligonucléotides physisorbés. Ceci tient probablement du fait que nos échantillons d'Au(111) présentent des terrasses étendues sur lesquelles une couche de mercaptohexanol hautement organisée peut croître. En comparaison, sur leurs échantillons d'Au évaporé sur du verre à froid et présentant des cristallites nanométriques, l'organisation de la couche de mercaptohexanol n'est pas suffisante pour que les molécules du film entrent en compétition avec les oligonucléotides chimisorbées. Cette passivation avec une molécule hydrophile aboutit donc à une surface présentant des oligonucléotides bien isolés sur la surface avec lesquels l'ADN peut s'hybrider.



**Figures 9.** Passivation d'une surface d'Au saturée en oligonucléotides:<sup>40</sup>

**9a)** Image AFM de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , échelle z 3nm, d'une surface saturée en oligonucléotides : Les molécules forment un tapis avec des trous de 1nm de profondeur.

**9b)** Immersion dans une solution aqueuse d'alkylthiol : l'image AFM de  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ , échelle z 7nm, montre des oligonucléotides regroupés qui forment des lignes compactes de quelques nm de haut, entourés d'un film homogène d'alkylthiols de 1 nm de haut. Cette passivation avec une molécule hydrophobe rend donc les oligonucléotides peu disponibles à l'hybridation.

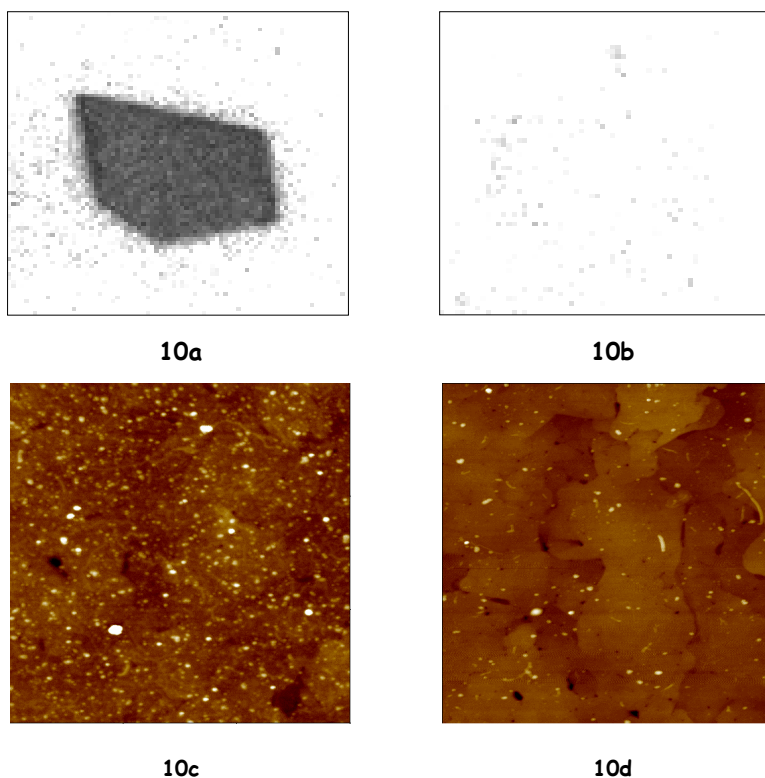
**9c)** Immersion dans une solution aqueuse de mercaptohexanol : l'image AFM de  $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$ , échelle z 2nm, montre une forte désorption des oligonucléotides. Les molécules restantes sont dispersées sur la surface sous forme de boules de 1 nm de haut entourées d'un film homogène de mercaptohexanol. Leur comptage donne 100-200 oligonucléotides par  $\mu\text{m}^2$ . Cette passivation avec une molécule hydrophile aboutit donc à une surface présentant des oligonucléotides bien isolés sur la surface avec lesquels l'ADN peut s'hybrider.

## II. Hybridation de la surface oligonucléotides/Au passivée au mercaptohexanol

Après passivation, les oligonucléotides étant bien dispersés sur la surface, ils acquièrent une liberté configurationnelle leur permettant de former une double hélice avec un ADN complémentaire. Pour cela, deux brins d'ADN, que nous appellerons ADNsb, sont obtenus par la rétrotranscription d'un ARN messager d'intérêt pour les biologistes du Laboratoire Technological Advances for Genomics and Clinics (TAGC, INSERM U928). Un des brins étant complémentaire à l'oligonucléotide sur 25 bases et l'autre étant « entièrement anti-complémentaire », la sélectivité des surfaces fonctionnalisées est vérifiée. De plus, les brins sont marqués par radioactivité  $\text{P}^{32}$  lors de la rétrotranscription pour comparer avec les données des images AFM.

Une fois l'ADNsb hybridé, sa partie appariée à l'oligonucléotide donne un double brin relativement « rigide ». Quant à sa partie libre, elle se présente comme une chaîne linéaire d'oligonucléotide de diamètre inférieur à la molécule double brin, possédant une grande flexibilité et la possibilité de subir d'importantes déformations. Elle est généralement modélisée par une chaîne de type polymère gaussien<sup>41</sup>, c'est-à-dire que chaque monomère peut être représenté par un vecteur orienté aléatoirement, avec une prise en compte des interactions électrostatiques de répulsion entre les groupements phosphates et les appariements entre bases. Cependant, l'hybridation s'opérant dans un bain concentré en sel, des appariements entre bases complémentaires d'un même brin peuvent avoir lieu, facilités par la présence de contre-ions qui neutralisent la charge des groupements phosphates<sup>42</sup>. Par conséquent, nous attribuons les objets de 2,5nm de haut aux ADNsb hybridés (figure 10c).

Les images de radioactivité sur une surface d' $1\text{cm}^2$  montrent une hybridation efficace avec les ADNsb complémentaires (figure 10a) et une faible physisorption des ADNsb non complémentaires sur la surface d'oligonucléotide/Au passivée (figure 10b). Ceci est également observé sur les images AFM (figure 10c et 10d). Cependant, le comptage sur les images AFM sous-évalue considérablement le nombre d'ADNsb hybridés (figure 10c) par rapport aux mesures de radioactivité (figure 10a), dû à la mobilité des chaînes de certaines molécules qui les rend difficile à observer en AFM. De plus, certains objets de la surface « non hybridée » peuvent être attribués à des protéines contenues dans le bain d'hybridation (figure 10d). En effet, le film de mercaptohexanol rendant le substrat hydrophile par les groupements OH présents en surface, les protéines, comme les chaînes d'AND, peuvent s'y adsorber facilement. Lorsqu'il n'y a pas d'hybridation, les ADNsb non complémentaires et les protéines sont donc en compétition. Alors qu'en présence d'ADNsb complémentaires, la réaction d'hybridation de ces derniers est favorisée et leurs chaînes peuvent être mobiles sur la surface en faible interaction électrostatique avec les OH, devenant ainsi peu visibles à l'AFM. Une surface oligonucléotides/Au passivée hydrophobe éviterait ces interactions mais elle inhiberait aussi l'hybridation.



**Figures 10 :** Estimation du nombre d'hybridation par AFM et par mesures de radioactivité des surfaces d'oligonucléotides/Au passivées au mercaptohexanol, mises en condition d'hybridation :<sup>40</sup>

**10a) et 10c)** avec l'ADNsb complémentaire : le nombre d'ADNsb présents sur la surface de  $1\times 1\text{cm}^2$  est de l'ordre de  $5.10^3.\mu\text{m}^{-2}$  par comptage de la radioactivité et de  $10^3.\mu\text{m}^{-2}$  par dénombrement sur l'image AFM de  $1\times 1\mu\text{m}^2$ , échelle z 7nm.

**10b) et 10d)** avec l'ADNsb non complémentaire : le nombre d'ADNsb présents sur la surface de  $1\times 1\text{cm}^2$  est de l'ordre de  $10.\mu\text{m}^{-2}$  par comptage de la radioactivité et de  $50.\mu\text{m}^{-2}$  par dénombrement sur l'image AFM de  $1\times 1\mu\text{m}^2$ , échelle z 7nm.

La différenciation entre l'oligonucléotide non hybridé et l'ADNsb hybridé est possible avec l'AFM grâce à la différence de taille. Les surfaces d'oligonucléotides/Au passivées au mercaptohexanol sont sélectives vis-à-vis de la réaction d'hybridation.

### **III. Conclusion sur l'hybridation de l'ADN**

La méthode de passivation de la surface oligonucléotides/Au avec une molécule hydrophile, le mercaptohexanol, permet d'obtenir des oligonucléotides chimisorbées dispersées sur la surface et disponibles à l'hybridation avec un ADNsb. De plus, la différenciation entre l'oligonucléotide non hybridé et l'ADNsb hybridé est possible avec l'AFM grâce à la différence de taille. Enfin, l'étude montre la sélectivité de la surface fonctionnalisée vis-à-vis de la réaction d'hybridation, confirmée par des mesures de radioactivité sur l'ADNsb marqué. Cependant, un compromis apparaît entre une surface oligonucléotides/Au passivée hydrophile qui favorise l'hybridation et une surface hydrophobe qui améliore la quantification par AFM des phénomènes d'hybridation.

## Conclusion générale

Dans ce premier chapitre de mon travail, mon objectif a été d'acquérir un savoir-faire dans la fonctionnalisation de surface pour des applications en biotechnologie. Le but étant la détection de molécules uniques ou d'assemblages de molécules, je me suis intéressée aux techniques de champ proche, notamment à la microscopie à force atomique, et aux techniques d'analyse chimique (XPS, AES). J'ai alors étudié différentes méthodes de fonctionnalisation pour lesquelles je me suis attachée à comprendre les structures observées et à expliquer les phénomènes d'adsorption. En effet, outre l'application, les surfaces fonctionnalisées présentent un réel intérêt d'un point de vue fondamental.

L'étude systématique sur le système AAPS/mica a montré des interactions molécules-surfaces fortement dépendantes du pH en solution, qui donnent peu de structuration de la surface. En comparaison, des couches hautement organisées sont obtenues en phase vapeur, dues aux interactions latérales des silanes tri-fonctionnels, qui sont adaptées pour une observation à l'AFM. Toutefois, la couche semble peu ancrée à la surface rendant le système peu robuste aux traitements successifs pour greffer un oligonucléotide. En effet, des travaux ont montré par la suite l'amélioration de l'ancrage des molécules en choisissant un silane monofonctionnel.<sup>35</sup> Ainsi on s'affranchit des problèmes d'interactions latérales entre molécules mais pour notre application, il faut s'assurer de la formation d'une monocouche assez homogène pour un suivi en AFM.

Le projet sur le système oligonucléotide/Au a permis de remonter aux mécanismes d'adsorption des molécules sur la surface. Les propriétés étudiées (cinétique en deux étapes, physisorption sur les structures de la surface, facteur cinétique de la chimisorption, diffusion sur la surface) sont fondamentales pour comprendre les étapes de passivation et d'hybridation. Ainsi, des surfaces fonctionnalisées sélectives vis-à-vis de l'hybridation sont obtenues. Enfin, l'achèvement de ce travail a été la détection de l'hybridation par l'AFM, ce qui m'a incité à poursuivre mon activité de recherche sur la détection d'objets uniques par différentes méthodes.



## BIBLIOGRAPHIE du Chapitre 1

- <sup>1</sup> Mahadevappa M., Warrington J. A., A high-density probe array sample preparation method using 10- to 100-fold fewer cells, *Nature Biotech*, **17**, 1134-1136(1999)
- <sup>2</sup> Binnig G., Quate C. F., Gerber C. H., *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 55 (1986)
- <sup>3</sup> Hansma H. G. et al., *Science*, **256**, 1180 (1992)
- <sup>4</sup> Souteyrand E., Cloarec J. P., Martin J. R., Wilson C., Lawrence I., Mikkelsen S., Lawrence M. F., *J. Phys. Chem.*, **101**, 2980-2985 (1997)
- <sup>5</sup> Cloarec J. P., Martin J. R., Polychronakos C., Lawrence I., Lawrence M. F., Souteyrand E., *Sensors and Actuators B*, **58**, 394-398 (1999)
- <sup>6</sup> Chrisey L. A., Lee G. U., O'Ferrall C. E., Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3031-3039 (1996)
- <sup>7</sup> Herne T. M., Tarlov M. J., Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8916-8920 (1997)
- <sup>8</sup> Levicky R., Herne T. M., Tarlov M. J., Satija S. K., Using self assembly to control the structure of DNA monolayers on gold : a neutron reflectivity study, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9787 (1998)
- <sup>9</sup> Steel A. B., Herne T. M., Tarlov M. J., *Analytical Chemistry*, **70**, 4670-4677(1998)
- <sup>10</sup> Peterlinz A., Georgiadis M., Herne T. M., Tarlov M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3401 (1997)
- <sup>11</sup> Kelley S. O., Barton J. K., Jackson N. M., McPherson L. D., Potter A. B., Spain E. M., Allen M. J., Hill M. G., *Langmuir*, **14**, 24, 6781-6784 (1998)
- <sup>12</sup> Lisdat F., Ge B., Scheller F. W., *Electrochemistry Communications*, **1**, 65-68 (1999)
- <sup>13</sup> Huang E., Satjapipat M., Han S., Zhou F., *Langmuir*, **17**, 1215-1224 (2001)
- <sup>14</sup> Hansma H. G., Revenko I., Kerry K., Laney D. E., *Nucleic Acids Research*, **24**, 4, 713-720 (1996)
- <sup>15</sup> Shlyakhtenko L. S., Gall A. A., Weimer J. J., Hawn D. D., Lyubchenko Y. L., *Biophysical Journal*, **77**, 568-576 (1999)
- <sup>16</sup> Bezanilla M., Manne S., Laney D. E., Lyubchenko Y. L., Hansma H. G., *Langmuir*, **11**, 655 (1995)
- <sup>17</sup> Lyubchenko Y. L., Blankenship R. E., Gall A. A., Lindsay S. M., Thiemann O., Simpson L., Shlyakhtenko L. S., *Scanning Microsc. Suppl.*, **10**, 97 (1996)
- <sup>18</sup> Tätté T., Saal K., Kink I., Kurg A., Lohmus R., Mäeorg U., Rahi M., Rinken A., Lohmus A., *Surface Science*, **532**, 1085-1091 (2003)
- <sup>19</sup> Diez-Perez I., Luna M., Teheran F., Ogletree D. F., Sanz F., Salmeron M., *Langmuir*, **20**, 1284 (2004)
- <sup>20</sup> Crampton N., Bonass W. A., Kirkham J., Thomson N., *Langmuir*, **21**, 7884-7891 (2005)
- <sup>21</sup> Crampton N., Bonass W. A., Kirkham J., Thomson N., *Ultramicroscopy*, **106**, 765-770 (2006)
- <sup>22</sup> Klein H., Blanc W., Pierrisnard R., Fauquet C., Dumas Ph., *Eur. Phys. J. B*, **14**, 371-376 (2000)
- <sup>23</sup> Ek S., Iiskola E. I., Niinistö L., *J. Phys. Chem. B*, **108**, 9650-9655 (2004)
- <sup>24</sup> Trens P., Denoyel R., Rouquerol J., *Langmuir*, **11**, 551-554 (1995)

- <sup>25</sup> Mourougou-Candoni N., and Thibaudau F., Formation of aminosilane film on mica, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 39 13026-13034 (2009)
- <sup>26</sup> Heiney P. A., Grüneberg K., Fang J., Dulcey C., Shashidhar R., *Langmuir*, **16**, 2651 (2000)
- <sup>27</sup> Holmes-Farley S. R., Bain C. D., Whitesides G. M., *Langmuir*, **4**, 921-937 (1988)
- <sup>28</sup> Note : Acid base titration of AAPS has been carried out and has given two values of pKa, 8.5 and 10.2. These values correspond to the base/acid couples NH/NH<sub>2</sub><sup>+</sup> of the secondary amine and NH<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub><sup>+</sup> of the terminal primary amine of AAPS respectively.
- <sup>29</sup> Maslova M. V., Gerasimova L. G., Forsling W., *Colloid journal*, **6**, 322-328 (2004)
- <sup>30</sup> White L. D., Tripp C. P., *J. Colloid Interface Sci.*, **232**, 400-407 (2000)
- <sup>31</sup> Zhang F., Srinivasan M. P., *Langmuir*, **20**, 2309 (2004)
- <sup>32</sup> Sugimara H., Hozumi A., Kayemana T., Takai O., *Surf. Interface Anal.*, **24**, 550 (2002)
- <sup>33</sup> Song X., Zhai J., Wang Y., Jiang L., *J. Colloid Interface Sci.*, **298**, 267 (2006)
- <sup>34</sup> Huang N. P., Michel R., Voros J., Textor M., Hofer R., Rossi A., Elbert D. L., Hubbel J. A., Spencer N. D., *Langmuir*, **17**, 489 (2001)
- <sup>35</sup> Lallemand D., Rouillat M. H., Dugas V., Chevelot Y., Souteyrand E. and Phaner-Goutorbe M., AFM characterization of ss-DNA probes immobilization: a sequence effect on surface organization, *Journal of Physics: Conference Series*, **61**, 658-662 (2007)
- <sup>36</sup> Mourougou-Candoni N., Naud C., Thibaudau F. Adsorption of Thiolated Oligonucleotides on Gold Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study, *Langmuir*, **19**, 682-686 (2003)
- <sup>37</sup> Tinland B., Pluen A., Sturm J., Weill G., *Macromolecules*, **30**, 5763-5765 (1997)
- <sup>38</sup> Lavrich D. J., Wetterer S. M., Bernasek S. L., Scoles G., *J. Phys. Chem. B*, **102**, 3456 (1998)
- <sup>39</sup> Dubois L. H., Nuzzo R. G., Synthesis, structure and properties of model organic surfaces, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **43**, 437-463 (1992)
- <sup>40</sup> Mourougou-Candoni N., Thibaudau F., Nguyen C., Surfaces for the observation by Atomic Force Microscopy of DNA hybridization with oligonucleotides, en préparation pour *Langmuir*
- <sup>41</sup> Zhang Y., Zhou H., and Ou-Yang Z. C., Stretching Single-Stranded DNA: Interplay of Electrostatic, Base-Pairing, and Base-Pair Stacking Interactions, *Biophys. J.*, **81**, 1133 (2001)
- <sup>42</sup> Montanari A., and Mézard M., Hairpin Formation and Elongation of Biomolecules, *Phys. Rev. Lett.*, **86**, 2178 (2000)



# Formation of Aminosilane Film on Mica

N. Mourougou-Candoni\* and F. Thibaudau

Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille, CNRS, Aix-Marseille Université, France

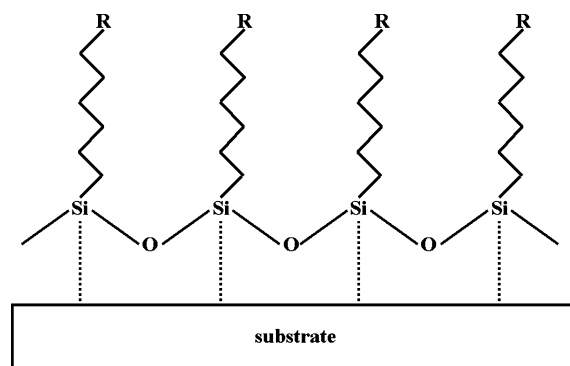
Received: April 2, 2009; Revised Manuscript Received: July 30, 2009

Aminosilane film on mica is investigated in this work for further use as a substrate for DNA immobilization. We study the deposition of *N*-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane (AAPS) on mica surfaces by atomic force microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, and contact angle measurements. Deposition both in aqueous solution and in vapor-phase is explored. In aqueous solution, it is found that the interactions of molecules with the mica surface are pH-dependent. In the case of vapor phase deposition, a multilayer film composed of a first monolayer and successive bilayers is obtained. This is the first observation of the organization of aminosilane films on mica.

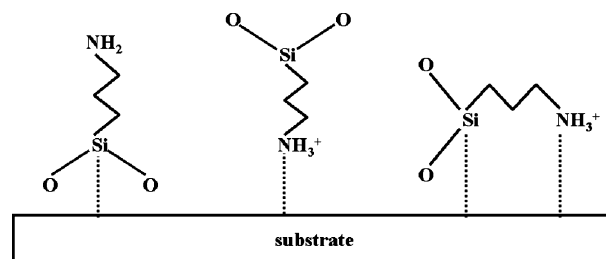
## Introduction

Chemical modification of solid surfaces with organic molecules such as alkylsilanes is of great interest in various fields, such as biosensors,<sup>1,2</sup> microelectronics,<sup>3,4</sup> catalysis,<sup>5,6</sup> etc. For this purpose, alkylsilanes are grafted on glass,<sup>7</sup> silicon,<sup>8–15</sup> or mica<sup>16–21</sup> surfaces. Generally, it is assumed that molecules adsorb in an ordered film on the surface. Alkyl groups form Si–O covalent bonds between the molecules or with the surface hydroxyl groups to build up a polymeric film anchored on the surface. In the case of bifunctionalized molecules, with a terminal group R such as H<sub>2</sub>N<sup>+</sup>, HO<sup>–</sup>, HS<sup>–</sup>, HSO<sub>3</sub><sup>–</sup>, Cl<sup>–</sup>, and Br<sup>–</sup>, the second functionality R is expected to extend from the surface (Figure 1). However, often, more disordered monolayers are observed.<sup>8–11</sup> Indeed, usually, both terminal groups are able to interact with the surface through hydrogen or electrostatic bonds, resulting in various configurations, as shown in Figure 2 for aminosilanes.<sup>12,13</sup> Furthermore, because interactions between the molecules and the surface depend drastically on experimental conditions and on the substrate properties, a lack of reproducibility in film formation is often observed.

In this work, we are interested in aminosilane film on mica for further use as a substrate for DNA immobilization and hybridization studies with atomic force microscopy (AFM). For observation on a nanometer scale, clean surfaces with large atomically flat terraces are required, as displayed by silica or mica surfaces. The latter is preferred for applications using near field microscopy. In our study, we use *N*-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane (AAPS) to illustrate the functionalization of mica with aminosilanes. The molecular structure of AAPS is shown in Figure 3. The adsorption of AAPS has been studied on silica, and authors have described it as in Figure 1.<sup>22,23</sup> However, no experiment confirming this scheme has been reported for AAPS on mica. In contrast to silica, no native hydroxyl groups are present on mica surfaces.<sup>21</sup> In addition, mica displays a large negative surface charge density in solution, which can form electrostatic bonds with protonated amine groups of aminosilane.<sup>24</sup> To address this issue, we study the formation of AAPS film on mica. Our investigation is based on surface chemical analysis by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), direct visualization of the surface with nanoscopic resolution using atomic force microscopy (AFM), and contact angle measurements. Both deposition in aqueous solution, as previously done by Chrisey et al.,<sup>22</sup> and vapor-phase deposition are explored.



**Figure 1.** Idealized representation of bifunctionalized silanes grafted onto a surface: molecules hydrolyze on the alkyloxy end and condense with substrate hydroxyls through a covalent bond Si–O–Si. They also polymerize by reacting with each other to construct a strong network with intermolecular cross-linking bonds.



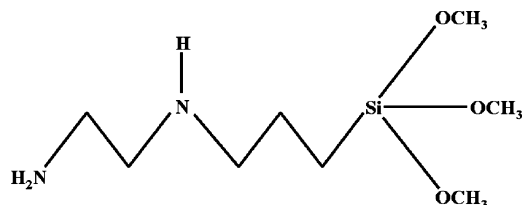
**Figure 2.** Different ways of binding of aminosilanes on the surface: molecules adsorb on the surface via covalent bonds Si–O–Si, electrostatic interactions with a protonated amine, or both.

copy (XPS), direct visualization of the surface with nanoscopic resolution using atomic force microscopy (AFM), and contact angle measurements. Both deposition in aqueous solution, as previously done by Chrisey et al.,<sup>22</sup> and vapor-phase deposition are explored.

## Materials and Methods

All chemicals were of commercial grades of highest purity. Pure *N*-(2-aminoethyl)3-aminopropyltrimethoxysilane (AAPS) is aliquoted in a nitrogen glovebox (relative humidity 10–12%) and kept at –30 °C until required. Muscovite mica is purchased from Metafix. Prior to use, all dishes and instruments are

\* Corresponding author address: CNRS UPR 3118, CINAM, Aix-Marseille Université, 163 Avenue de Luminy, case 913, F-13288 Marseille cedex 09, France. Phone: +33(0)617248087. Fax: +33(0)491 829176. E-mail: candoni@cinam.univ-mrs.fr. Web: <http://www.cinam.univ-mrs.fr/>.



**Figure 3.** The molecular structure of AAPS.

carefully cleaned in a hot solution (60 °C) containing 15%  $\text{NH}_3$  and 15%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in pure water (18 M $\Omega$  cm resistivity) for half an hour. This is followed by thorough rinsing with pure water and subsequent drying under nitrogen flow.

For the treatment of mica, freshly cleaved sheets (1 × 1 cm<sup>2</sup>) are first hydrated to create hydroxyl groups on the surface.<sup>25</sup> This is carried out by either exposing the surface to a jet of steam as proposed by Schwartz et al.<sup>26</sup> or immersing the sample in deionized water (18.2 M $\Omega$  cm resistivity). The hydrated surface of mica is then exposed to AAPS molecules either in the aqueous phase or in vapor phase.

Experiments of AAPS deposition in aqueous phase are inspired by the procedure used by Chrisey et al. on silicon oxide.<sup>22</sup> The hydrated mica sheet is incubated in a solution of AAPS diluted in pure water for a given time. Then the sample is removed from the solution, rinsed with pure water and dried under a stream of nitrogen for AFM experiments. For XPS analyzes, the procedure is similar except for pH studies, for which samples are not rinsed with water before drying (as we will explain further). It should be noted that AAPS molecules can polymerize in solution before they reach the sample surface, as has been observed with other aminosilanes.<sup>13–15</sup> To minimize this phenomenon, we prepared low-concentration AAPS solutions ranging from 40  $\mu\text{M}$  to 4 mM. The dilution of AAPS in water at these concentrations makes the pH vary from 8.9 to 9.5. For pH studies, lower and higher values of pH are obtained by adding acetic acid (pH from 1.5 to 8.9) or KOH (pH from 9.5 to 13), respectively.

Regarding the vapor-phase deposition, the hydrated mica sheet is first dried on each side by holding it horizontally above a hot plate. Thus, all macroscopic traces of water are removed. Then the sample is placed together with a Petri dish containing 1 mL of pure AAPS in a chamber under anhydrous nitrogen atmosphere. The sample is left in the AAPS vapor from 1 h to 48 h at room temperature.

In this study, a set of several samples was prepared for each experiment. AFM imaging is realized a few hours after the sample treatment. It is performed in ambient atmosphere using the intermittent contact mode (also known as “tapping mode”) at a scan frequency of 1–2 Hz. Surface topography is obtained with uncoated silicon cantilever tips of  $\sim 15$  nm apex diameter. The AFM images presented here are processed with flatten and contrast enhancement processing from Nanoscope III software. Contact angle measurements are performed on a home-built apparatus at ambient temperature and humidity. A micropipeter is used to dispense 10  $\mu\text{L}$  drops of deionized water at multiple points across the substrate surface. Water drop images are recorded with a CDD camera and angles are determined manually.

**X-ray Photoelectron Spectroscopy.** XPS experiments are carried out on a spectrometer set up with the Mg K $\alpha$  (1253.6 eV) or Al K $\alpha$  (1486.6 eV) source. The base pressure in the chamber is 10<sup>−9</sup> mbar. Samples are analyzed at an angle of 72° relative to the electron detector.

On AAPS-treated mica surfaces, we observe a nitrogen N 1s peak due to AAPS and an aluminum Al 2p peak due to mica.

Therefore, these two energy peaks provide a good signature for the film on the surface. To evaluate the layer thickness,  $d$ , we measure the ratio of the N 1s peak intensity to Al 2p one,  $I_{\text{N}}$ , and  $I_{\text{Al}}$ , respectively. These peaks are fitted by a Gaussian function, and their intensity and energy are given by the area and the center of the Gaussian, respectively. However, as a good insulator, the mica surface charges up, inducing a shift in the peaks' energy. To correct this shift, all binding energies are referenced to the Al 2p peak, assuming that its position is at 74.5 eV.<sup>27</sup> Errors in ratio evaluation and peak position are typically within  $\pm 10\%$  and  $\pm 0.25$  eV, respectively.

Regarding the N 1s peak centered around 400.0 eV, measurements performed with a low energy pass show that it can be deconvoluted into two different Gaussians corresponding to different binding states of nitrogen. These binding energies of 399.3 and 401.3 eV correspond to free amine and protonated amine, respectively.<sup>28</sup> However, to increase the signal-to-noise ratio, we usually use a high-energy pass. In this case, the N 1s peak is fitted by a single Gaussian function that includes both binding states of amine. We check that the ratio of the areas of the two fitted Gaussians corresponds to the ratio between the free and protonated species of amine.

The ratio of N 1s to Al 2p peak intensities ( $I_{\text{N}}/I_{\text{Al}}$ ) is compared to the ratio calculated for a homogeneous layer supported on a substrate. For this purpose, photoelectron intensities are given by the following equations:

$$I_{\text{N}} = \phi \sigma_{\text{N}} \sum_{\text{N}} k \lambda_{\text{N}} \cos(\theta) \left( 1 - e^{-\left( \frac{d}{\lambda_{\text{N}} \cos(\theta)} \right)} \right)$$

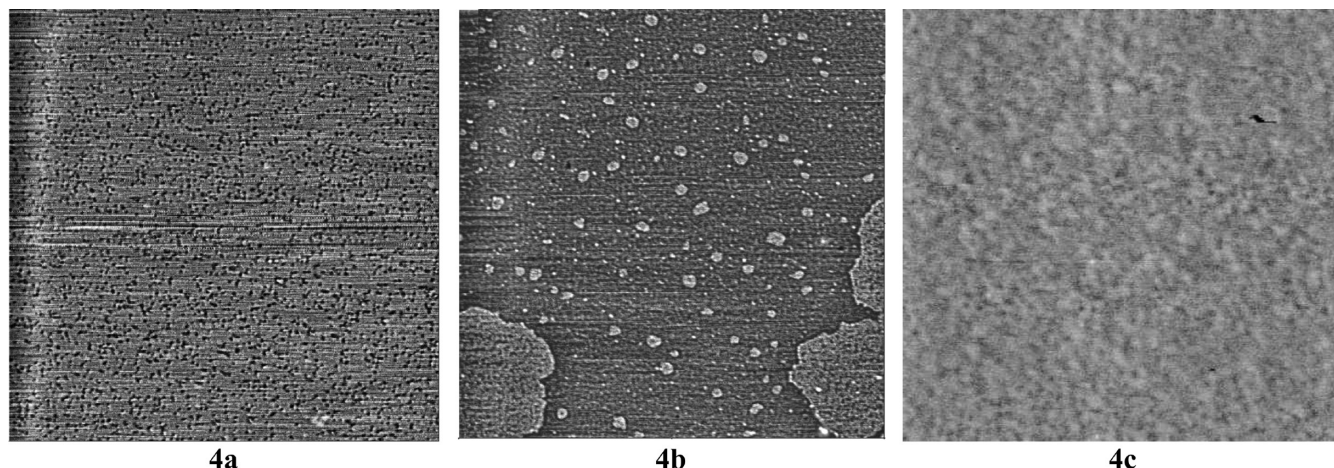
$$I_{\text{Al}} = \phi \sigma_{\text{Al}} \sum_{\text{Al}} k \lambda_{\text{Al}} \cos(\theta) e^{-\left( \frac{d}{\lambda'_{\text{Al}} \cos(\theta)} \right)}$$

where  $\phi$  is the X-rays flux;  $\sigma$  is the photoionization cross section;  $k$  is the instrument factor;  $\lambda_{\text{N}}$  is the inelastic mean free path of N 1s photoelectrons in the layer of AAPS;  $\lambda_{\text{Al}}$  is for Al 2p photoelectrons in mica, and  $\lambda'_{\text{Al}}$  is for Al 2p photoelectrons through the layer of AAPS;  $\Sigma$  is the surface density of atoms; and  $\theta$  is the angle between the direction at which electrons are collected and the surface normal. This gives a ratio  $I_{\text{N}}/I_{\text{Al}}$ :

$$\frac{I_{\text{N}}}{I_{\text{Al}}} = \frac{\sigma_{\text{N}} \sum_{\text{N}} \lambda_{\text{N}} \left( 1 - e^{-\left( \frac{d}{\lambda_{\text{N}} \cos(\theta)} \right)} \right)}{\sigma_{\text{Al}} \sum_{\text{Al}} \lambda_{\text{Al}} e^{-\left( \frac{d}{\lambda'_{\text{Al}} \cos(\theta)} \right)}}$$

The surface density of N ( $\Sigma_{\text{N}}$ ) is calculated for a monolayer of AAPS, supposing that its height is 1 nm and its specific molecular area is 21  $\text{\AA}^2$ . This gives a value of  $4.30 \times 10^{14}$  atoms per cm<sup>2</sup> for  $\Sigma_{\text{N}}$ . The surface density of Al ( $\Sigma_{\text{Al}}$ ) can be deduced from the crystallographic structure of mica, which displays 12 Al atoms for 0.935 nm<sup>3</sup> of volume, giving a density of  $2.56 \times 10^{15}$  Al atoms per cm<sup>2</sup>.<sup>7</sup>

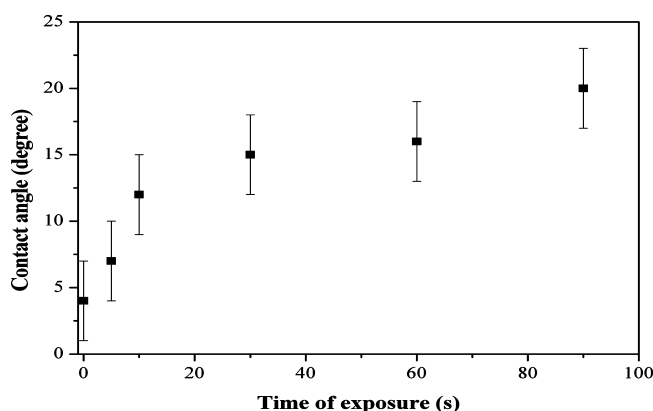
The ratio of the cross sections  $\sigma_{\text{N}}/\sigma_{\text{Al}}$  is directly obtained from  $\sigma_{\text{K}}/\sigma_{\text{Al}}$ , assuming that  $\sigma_{\text{N}}$  corresponds to 95% of  $\sigma_{\text{K}}$ , as previously evaluated by many authors.<sup>29–31</sup>  $\sigma_{\text{K}}/\sigma_{\text{Al}}$  is determined from the ratio of K2s to Al 2p intensities measured on bare mica. The mean free paths are calculated with the approximated formula given by Seah and Dench.<sup>32</sup> Finally, this leads to an expected ratio  $I_{\text{N}}/I_{\text{Al}}$  of 1.3 for a 1-nm-thick homogeneous monolayer of AAPS molecules on mica.



**Figure 4.** AFM images ( $2 \times 2 \mu\text{m}$  size) of the mica surface: (4a) exposed to a jet of steam for 30 s; holes correspond to a depth of 3–5 Å; (4b) exposed to a jet of steam for 90 s; islands correspond to a height of 1 nm; (4c) incubated in water for 10 min; holes correspond to a depth of 3–5 Å.

## Results and Discussion

**Hydration.** Thanks to the crystallographic structure of mica, a clean and very flat surface can be easily obtained by peeling off the outer leaflet of the surface using a simple cellophane tape. However, freshly cleaved mica lacks native surface hydroxyl groups,<sup>21</sup> so covalent binding essential for the formation of a well-anchored layer of AAPS seems unlikely. This problem is overcome by activating the surface through hydration to open up the silicate bonds.<sup>25</sup> Two methods of hydration are investigated in this study, by AFM and contact angle measurements. The first method consists of exposing the sample to a jet of steam.<sup>26</sup> After 30 s of exposure, the surface of mica presents 3–5 Å depth holes, Figure 4a. Longer exposure, such as 90 s, leads to more or less wide 2D islands with a height of 1 nm (Figure 4b). Because this height corresponds to the thickness of one mica leaflet, we attribute these islands to remaining pieces of the outer leaflet of mica, probably after a corrosion of the surface. Because an additional AAPS layer also has a height on the order of 1 nm, this kind of surface is obviously not suitable for our study. Unfortunately, steam treatment of mica is not reproducible enough to obtain a surface without such islands. The second method of hydration consists of incubating the sample in water at room temperature. After 10 min of incubation, the AFM image shows a flat surface with no islands (Figure 4c). In addition, this treatment leads to reproducible hydrated surfaces. Finally, the chemical modifications due to both surface treatments are assessed by contact angle measurements. These are done immediately after completion of the treatment. Freshly cleaved mica shows a highly hydrophilic surface with a contact angle smaller than  $5^\circ$ .<sup>33</sup> Incubation in water for 10 min makes it change to  $20^\circ$ . In the case of steam treatment, the contact angle measured on surfaces without islands increases with the time of exposure, also reaching  $20^\circ$  (Figure 5). The precision of measurements taken on substrates averages  $\sim 3^\circ$ . This small variation in contact angle suggests that the surface is likely to be homogeneous. Thus, both methods similarly modify wetting properties of the surface. Even if we have no indication of the presence or the number of hydroxyl groups on the surface, we observe a lack of AAPS adsorption during the treatment in the vapor phase on a freshly cleaved mica surface. For the adsorption in the aqueous phase, the AAPS film depends neither on the previous hydration nor on the hydration method. This indicates that during the incubation in

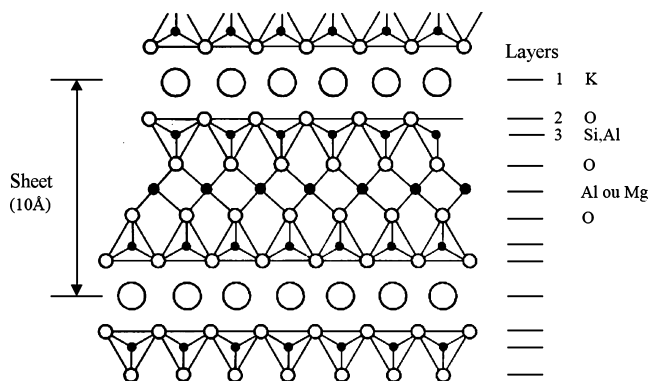


**Figure 5.** Contact angles formed by water drops on a surface of mica exposed to a jet of steam.

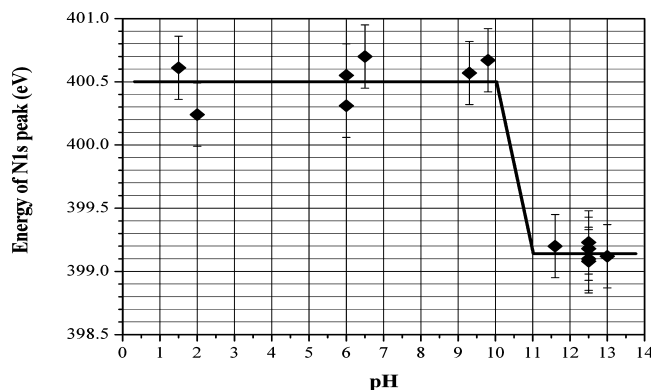
the AAPS solution, the surface modifies just like during incubation in water. Therefore, we chose the relevant hydration method depending on whether the subsequent AAPS layer is performed through vapor or aqueous deposition. For vapor phase deposition of AAPS, mica is first hydrated by a jet of steam after precautionary checking of the quality of the surface by AFM. For aqueous phase deposition, we routinely use the incubation method without checking the surface prior to AAPS deposition.

**AAPS Deposition in Aqueous Phase. Influence of Solution pH.** AAPS molecules contain two amines, and each of them can be protonated or not, according to the solution pH. The mica lattice contains negative binding sites associated with Al and filled with potassium ions,  $\text{K}^+$  (Figure 6). In fluid, these cations ( $\text{K}^+$ ) can be removed or displaced, as shown by surface force apparatus and XPS, presenting a negative surface potential.<sup>20</sup> For instance, protonated AAPS molecules (due to pH) can replace potassium ions, so they can adsorb preferentially on the surface. Therefore, pH must play a decisive role in the adsorption of AAPS on mica. In this work, we study the influence of pH on film formation by incubating in an aqueous solution of AAPS at different pH's for 5 min. Variation of the concentrations of AAPS from  $40 \mu\text{M}$  to 4 mM induces a slight increase in the pH from 8.9 to 9.5. Lower and higher values of the pH are obtained by adding acetic acid (pH from 1.5 to 8.9) or KOH (pH from 9.5 to 13), respectively. Because we are focusing on the protonation level of molecules adsorbed on the surface, XPS analyses are carried out focusing on the N 1s peak





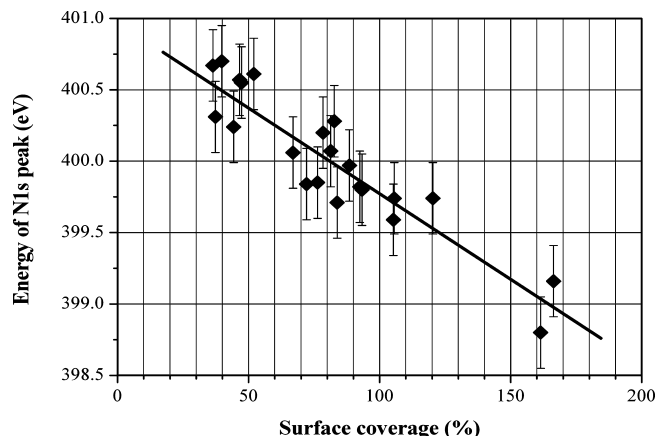
**Figure 6.** Composite layer structure of mica  $\text{KAl}_2\text{Si}_3\text{AlO}_{10}(\text{OH})_2$ . The cleavage, which takes place along the potassium layer, produces a new surface presenting half the number of the potassium ions.



**Figure 7.** Energy of N 1s peak versus pH of AAPS solution for a low surface coverage ( $I_{\text{N}}/I_{\text{Al}} < 0.7$ ).

of amines: the area of the peak gives the quantity of the adsorbed molecules, and its binding energy leads to the ratio of free amines to protonated ones. Because we are interested in the adsorption of molecules during the incubation in AAPS solution, we must point out that rinsing the sample with pure water (pH around 6) after AAPS adsorption turns out to be an issue. First, for highly concentrated solutions of AAPS (higher than 40 mM), the number of molecules measured with XPS decreases with rinsing, whereas it does not significantly vary for low-concentration solutions of AAPS (lower than 40 mM). This indicates that for low concentrations, the number of molecules left after drying the surface without rinsing can be negligible. Moreover, we observe that when the pH of the incubation solution is higher than 11, rinsing with pure water protonates molecules and shifts the N 1s peak energy. Consequently, for XPS studies, we use concentrations lower than 4 mM, and we do not rinse the sample after AAPS deposition. Our results obtained by varying parameters such as concentration and pH vary; however, they display a typical behavior: for a pH just under 10, the ratio  $I_{\text{N}}/I_{\text{Al}}$  giving the number of adsorbed molecules, increases slightly from 0.5 with concentration. In contrast, for a pH higher than 11, the number of adsorbed molecules drastically increases from  $I_{\text{N}}/I_{\text{Al}}$  of 0 to 0.6.

Figure 7 represents the binding energy of the N 1s peak versus the pH of the AAPS solutions. This figure gathers all of the experiments, leading to a ratio of  $I_{\text{N}}/I_{\text{Al}}$  under 0.7; that is, corresponding to a surface coverage below half of the compact monolayer (regardless of the solution concentration). We can distinguish two binding states of N 1s: the first one around 399.2 eV for pH's over 11 corresponds to AAPS molecules with both amines free (399.3 eV<sup>28</sup>). The second energy is around 400.5

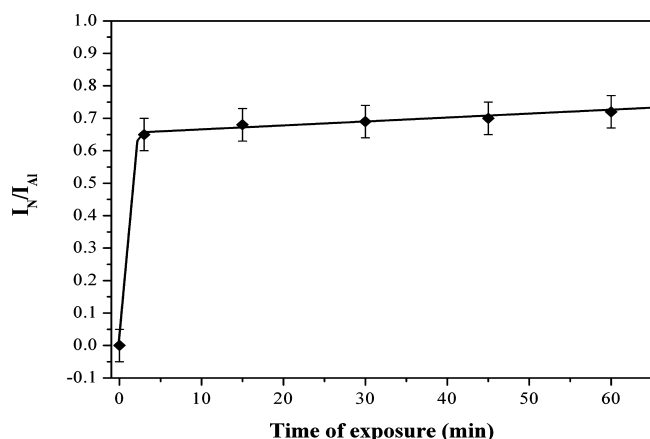


**Figure 8.** Energy of the N 1s peak versus the surface coverage of the AAPS on mica for pH < 10. The surface coverage is represented by a ratio of the compact monolayer.

eV for pH's under 10. This energy of 400.5 eV is approximately midway between the binding energy for both amines' being free and the one for both amines' being protonated (399.3 and 401.3 eV, respectively<sup>28</sup>). Therefore, this energy is clearly consistent with the protonation of one of the two amines. This pH-dependent behavior of the AAPS layer on the mica surface is typical of a weak base. In addition, our results can be related to the  $\text{p}K_{1/2}$  introduced by Holmes-Farley et al.<sup>35</sup> They defined the  $\text{p}K_{1/2}$  for a liquid–solid interface as the value of the pH of the solution at which the functional groups at the interface are half-ionized. In this framework, the  $\text{p}K_{1/2}$  of our film is in the 10–11 range. This value is the closest to the  $\text{p}K_{\text{a}}$  of the AAPS terminal amine; that is, 10.2 (the  $\text{p}K_{\text{a}}$  of the secondary amine is of 8.5).<sup>16,36</sup> Thus, we deduce that the amine that appears protonated at pH's lower than 10 is the terminal amine of the AAPS.

Focusing on solutions at low pH, from 1.5 to 10 (i.e., mainly containing protonated AAPS), we plot the energy of the N 1s peak versus the surface coverage of the AAPS molecules on the surface (Figure 8). This coverage varies from less than half to one and a half of the compact monolayer, whereas the energy of the N 1s peak decreases from 400.5 to 399 eV. These results mean that the composition of the adsorbed AAPS varies from molecules with the terminal amine protonated (400.5 eV, as explained above) to more and more molecules with both amines free (399 eV). Moreover, the maximum surface density reached by protonated AAPS molecules is around 40% of the compact monolayer density (Figure 8). We can relate the density of the protonated AAPS (i.e.,  $1.7 \times 10^{14}$  molecules  $\text{cm}^{-2}$ ) to the density of negative charges on the bare surface, which is on the order of  $1.8 \times 10^{14}$   $\text{cm}^{-2}$ .<sup>37</sup> Thus, our results clearly indicate that adsorption first proceeds by ionic interaction between the protonated amino groups and the negative charges of the surface until these are neutralized. Then electrostatic repulsion between protonated AAPS prevents their additional adsorption. Subsequently, only neutral molecules (with two free amines) are able to adsorb onto the surface.

For a high pH, from 11 to 13, we note that the concentration must be higher than 400  $\mu\text{M}$  to obtain a significant number of molecules on the surface (given by XPS measurement of the ratio  $I_{\text{N}}/I_{\text{Al}}$ ), whereas for pH's under 10, coverages in 0.4–0.6 order are reached with the lowest concentration (40  $\mu\text{M}$ ). Hence, in our range of concentrations, the adsorption behavior varies drastically according to the pH. In fact, for a pH higher than 11, none of the amines are protonated ( $\text{p}K_{\text{a}}$ 's of 8.5 and 10.2<sup>36</sup>), and the surface charges of the mica must be compensated by



**Figure 9.** Ratio  $I_N/I_{Al}$  of nitrogen (N 1s) and aluminum (Al 2p) peaks' intensities with time of incubation in AAPS solution at a concentration of 40  $\mu$ M in water.

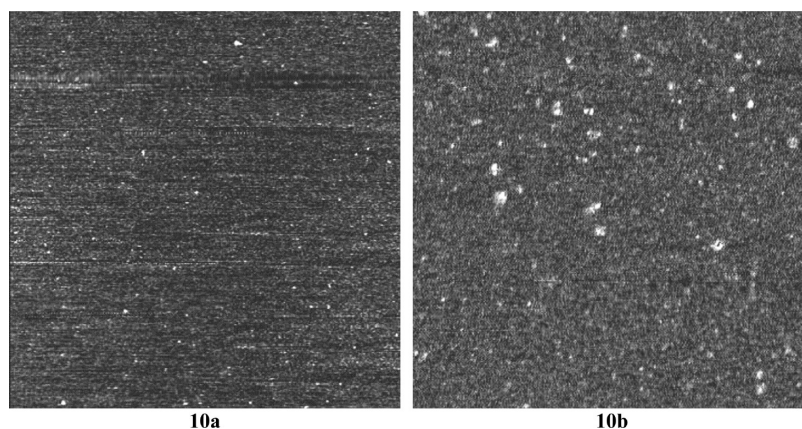
other cations of the solution ( $K^+$ ). Therefore, the interaction of the AAPS molecules with the surface is not electrostatic, in contrast with pH's under 10.

**Influence of Incubation Time.** We investigate the influence of incubation time in solutions of AAPS at 40  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, and 4 mM in pure water for time periods ranging from 5 to 45 min. After each experiment, XPS analyses are performed on mica surfaces to evaluate the intensities ratio  $I_N/I_{Al}$  of nitrogen (N 1s) and aluminum (Al 2p) peaks. Figure 9, plotted for 40  $\mu$ M, shows that this ratio increases rapidly within the first minutes and saturates at 0.6–0.7. A similar behavior is also observed for concentrations of 400  $\mu$ M and 4 mM, even if it is more rapid (plot not shown in this paper). It must be noted that the average value of 0.65 for the equilibrium ratio  $I_N/I_{Al}$  roughly corresponds to half of the value expected for a compact monolayer (ratio  $I_N/I_{Al}$  of 1.3 evaluated above). Hence, we suppose that molecules either cover half of the surface, being upright on it as presented in Figure 1, or they cover the whole surface more or less lying flat on it. The configuration of AAPS on the surface is explored by AFM imaging (Figure 10). For 5 min of exposure, the sample displays a homogeneous surface with a low roughness in the order of few angstroms (Figure 10a); no island or structure of 1 nm height (corresponding to AAPS height) can be seen on the AFM images. Thus, it is clear that these AFM data are more in agreement with molecules lying flat on the surface. For longer exposure, bumps of heterogeneous heights around 0.5–1 nm appear on the layer (Figure 10b). These bumps may correspond to small aggregates of upright

molecules that are condensed on the surface or that have been already formed in the solution.

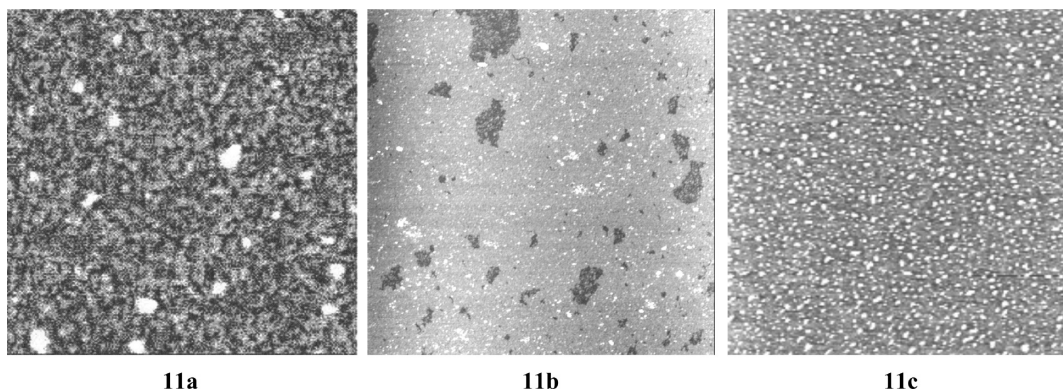
**AAPS Deposition in Vapor Phase.** Although AAPS adsorption in the liquid phase gives interesting results that depend on the pH, we note limitations due to film disordering on the surface and copolymerization of AAPS in the liquid. To overcome these problems, deposition in the vapor phase is also proposed in this work. In fact, the lower molecular density in the vapor phase should decrease the extent of self-polymerization. Thus, self-assembled monolayers have been obtained with silane on silicon.<sup>38</sup> In our experiments, the mica surface is exposed to AAPS vapor under an anhydrous nitrogen atmosphere for 15 min to 48 h, and afterward, the surface is imaged by AFM (Figures 11). For 15 min of exposure to AAPS, the surface appears rough with few bidimensional islands (Figure 11a). These islands and the surrounded surface heights are of 0.8 and 0.4–0.5 nm, respectively. This can be compared to the roughness of 0.2 nm of the substrate before its exposure to AAPS. After 1 h of exposure, Figure 11b shows a quite homogeneous film with holes of 0.8 nm depth (with few bumps). In addition, the contact angle of a water drop on the surface increases with exposure time, reaching  $\sim 50^\circ$  on the film. This value is in the range of contact angles reported for aminosilanes SAMs (40–63°).<sup>39</sup> Moreover, because the length of AAPS molecules is on the order of 1 nm, islands are probably formed by condensed upright AAPS molecules (0.8 nm), which are surrounded by prone molecules (0.4–0.5 nm). The film obtained after 1 h of exposure is undoubtedly a monolayer of upright molecules on the surface. According to these results, we infer that molecules first adsorb onto the surface in a disordered phase, and then they condense into islands, which grow and coalesce to form a monolayer.

For longer treatment (48 h), AFM images show that the surface roughens more, with bumps of  $\sim 2$ –4 nm height (Figure 11c). Hence, after the first monolayer has grown, adsorbed molecules instead form 3D clusters. This phenomenon is similar to the well-known Stransky–Krastanov crystalline growth mode. This mode appears when the interfacial energy between the surface and the first monolayer is lower than the surface energy of the monolayer and when the interfacial energy between the first monolayer and successive layers is higher than the surface energy of successive layers. Actually, this structure is not stable and changes with exposure to ambient atmosphere. Indeed, the surface morphology of the sample presented in Figure 11c is obviously modified after 24 h in ambient atmosphere (Figure 12a): it is covered with numerous small, bidimensional islands of 1.7 nm height and a few larger islands. However, “pinholes”

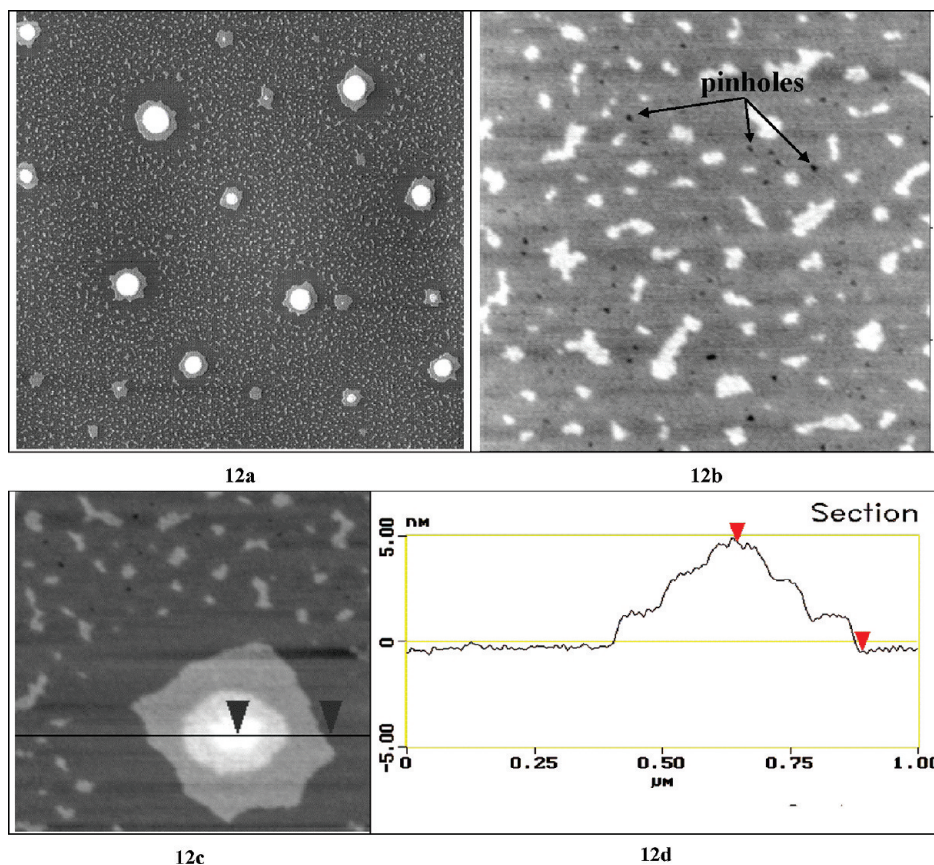


**Figure 10.** AFM images ( $2 \times 2 \mu$ m size) of hydrated mica surface incubated in a solution of AAPS at 40  $\mu$ M for 5 min (10a) and 45 min (10b). The darker to brighter features correspond to 1 nm height.





**Figure 11.** AFM images of hydrated mica surfaces exposed to vapor of AAPS under anhydrous nitrogen atmosphere at room temperature for 15 min (11a), ( $1 \times 1 \mu\text{m}$  size) the darker to brighter features correspond to 1 nm height; 1 h (11b): ( $2 \times 2 \mu\text{m}$  size), light gray to dark gray features correspond to 1 nm height; and 48 h (11c), ( $2 \times 2 \mu\text{m}$  size) dark gray to white features correspond to 10 nm height.

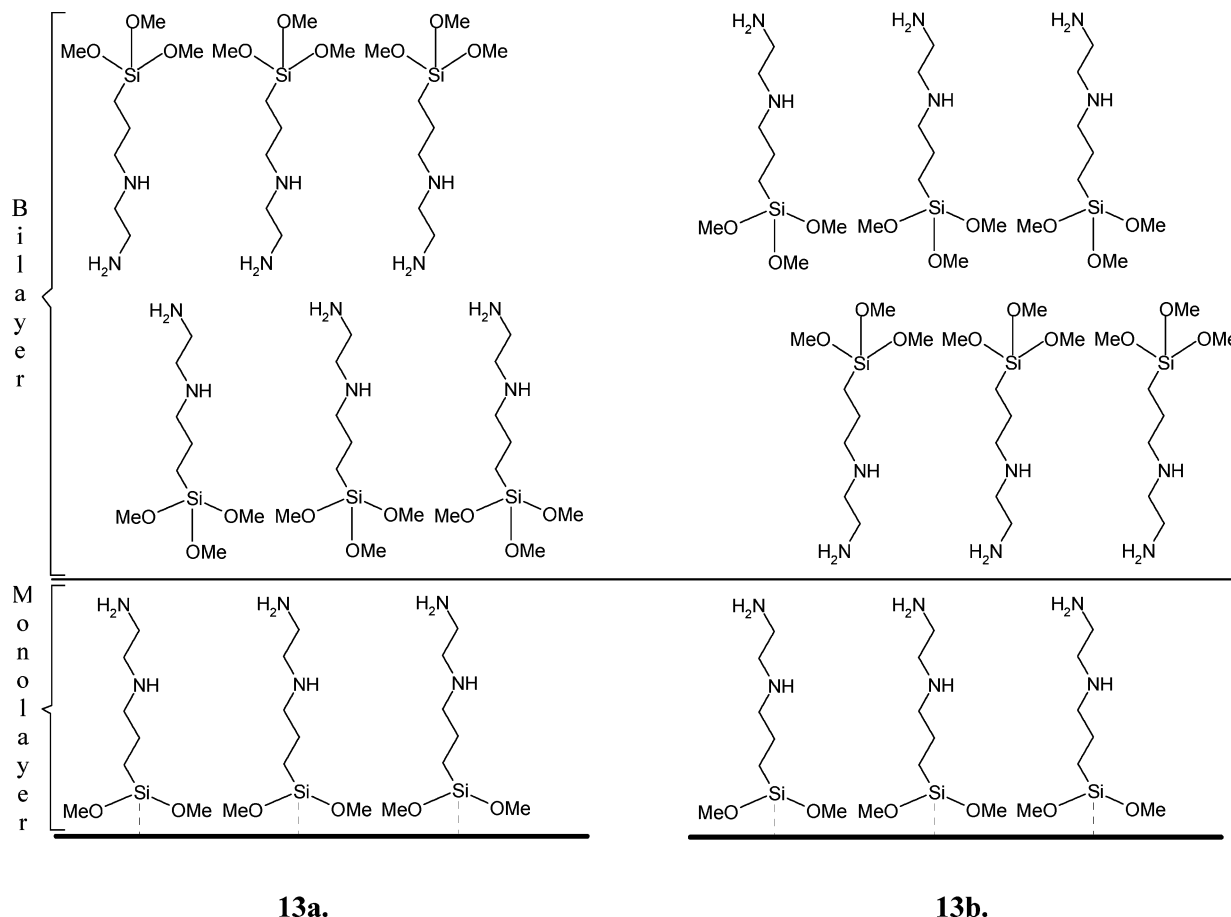


**Figure 12.** AFM images of mica surface treated for 48 h to vapor of AAPS and exposed 24 h in ambient atmosphere at room temperature: (12a)  $10 \times 10 \mu\text{m}$  size image, the darker to brighter features correspond to 15 nm height; (12b) magnified image ( $2 \times 2 \mu\text{m}$  size) of bilayer islands with pinholes of 0.8 nm depth on the film supporting the bilayer islands; (12c) magnified image ( $1 \times 1 \mu\text{m}$  size) of a high island with superposed bilayers; and (12d) section analysis of the high island of panel c.

of 0.8 nm depth on the film supporting the islands (Figure 12b) indicate that the first monolayer does not drastically change and that the restructuring instead concerns the matter on it. The depletion area surrounding the highest islands (Figure 12a) indicates that these grow from the surrounding matter. This is typical of a dewetting phenomenon. According to this reorganization, it is obvious that molecules are mobile prior to exposure to the ambient atmosphere. The more realistic assumption to explain this mobility is that polymerization is not complete after exposure to AAPS under anhydrous nitrogen atmosphere, certainly due to the lack of water molecules for the hydrolysis of the methoxy ends, whereas when the surface

shown in Figure 11c is exposed to ambient humidity, hydrolysis occurs, which triggers polymerization and film restructuring.

Concerning larger islands, some of them are of 1.7 nm height, too, but most of them display one or more stacked bidimensional islands of 1.7 nm height like a set of “Russian dolls”. For example, Figure 12c shows a large island composed of three stacked bidimensional islands of 1.7 nm height (see cross section in Figure 12d). Such a stacking indicates an order in the film above the first monolayer, perpendicular to the surface. The quantification of heights measured with AFM (of 0.8 nm for the first monolayer and 1.7 nm for islands) clearly rules out a nonstructured film, as in Figure 2.



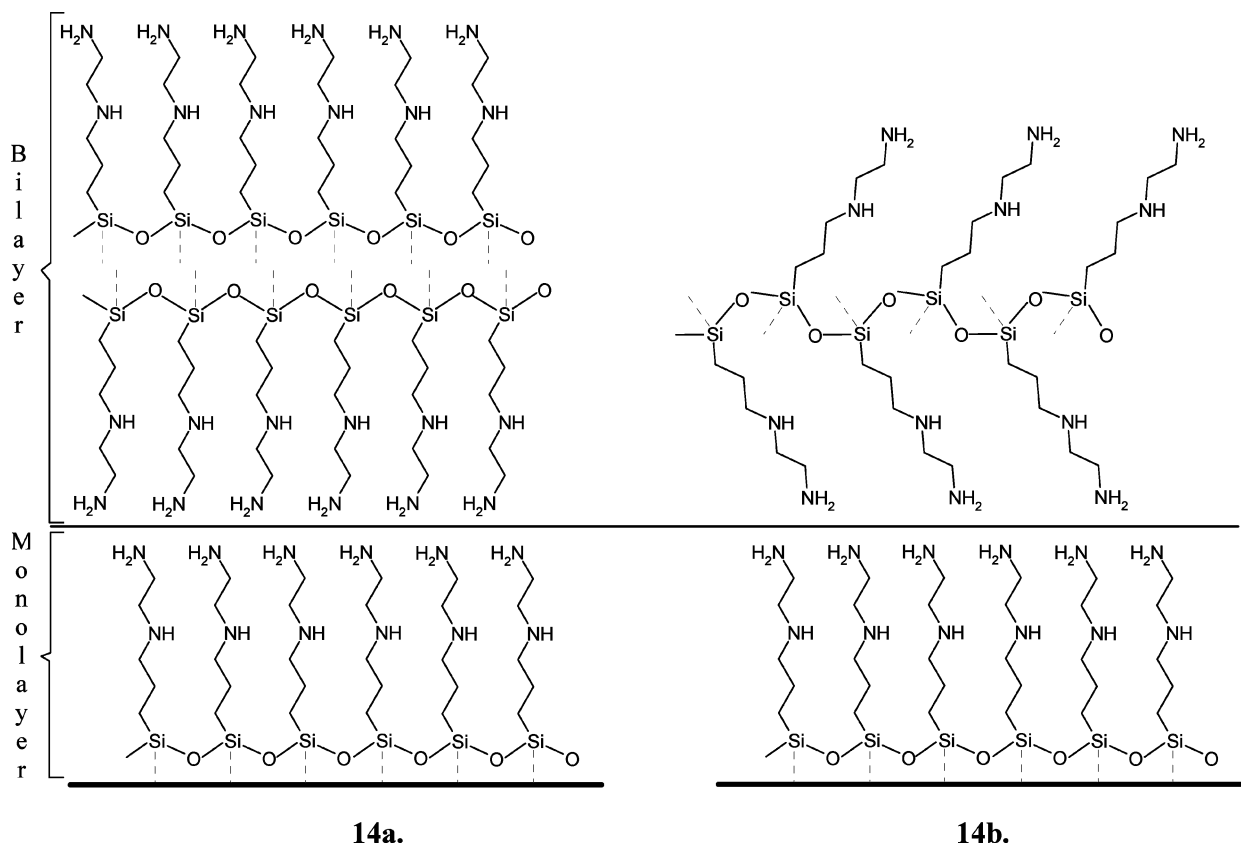
**Figure 13.** Possible configurations of the bilayer: molecules in the bilayer are standing either head-to-head or tail-to-tail. (The first monolayer is a self-assembly of upright molecules with amine ends mainly oriented outward.)

This study with AFM imaging and contact angle measurements allows us to deduce a schematic for the formation of AAPS layers on mica. For the first monolayer, a contact angle of  $\sim 60^\circ$  is expected for the 100% amino-terminated monolayer.<sup>40</sup> In our case ( $50^\circ$ ), we clearly obtain a uniform assembly of upright molecules with amine ends oriented mainly outward. In addition, this monolayer does not change from exposure under anhydrous atmosphere to ambient atmosphere (Figure 12b). This obviously means that molecules interact among themselves or with the surface when they adsorb under anhydrous atmosphere. However, Si–O covalent bonds must be rare due to the lack of water molecules for the hydrolysis of the methoxy ends. Therefore, molecules are probably self-assembled on the surface via van der Waals interactions.

For the film above the first monolayer, exposure to ambient atmosphere restructures it in bidimensional islands with a perpendicular periodicity of 1.7 nm, which is approximately twice the height of a monolayer. This suggests that islands are formed of one bilayer of upright molecules. If molecules in the bilayer were arranged head to tail, we would also observe a stacking periodicity of 0.8 nm order perpendicular to the surface. Consequently, molecules are standing either head-to-head, or tail-to-tail. According to these remarks, only two (coarse) orientations are possible for AAPS molecules of the film superposed to the first monolayer (Figure 13a and b). Moieties displayed at the interface with air are methoxy ends in Figure 13a and amine ends in Figure 13b. Therefore, contact angle measurements on the bilayer could discriminate between both configurations, but these measurements are quite imprecise, probably due to the mobility of the bilayer.

However, if the interaction between a tail and a head is preferential in the interface between the first monolayer and the subsequent film, as in the configuration of Figure 13a, then it is also the case inside the bilayer. Therefore configuration **13a** is not self-consistent, contrary to configuration **13b**.

More precisely, molecules oriented as in Figure 13b can display two structures. The first one, hereafter called a double-leaflet structure, consists of two superposed leaflets with structure and density similar to the first monolayer, molecules of a leaflet polymerizing with each other (Figure 14a). The second structure, hereafter called a single-leaflet structure, consists of only one sheet of 2D polymerized molecules, the tails of these molecules being alternatively localized on each side of the polymerization plan (Figure 14b). In this case, the density of tails on each side of the polymerization plan is half of that in the first layer, and we can expect that the tails of molecules are tilted to pack the structure. Of the two structures, the latter seems more realistic to us if we consider their formation. In fact, the double-leaflet structure, Figure 14a, implies that molecules of the leaflet close to the monolayer (inner leaflet) must be completely polymerized before the other leaflet (outer leaflet) extends on it. Otherwise a cross-polymerization will occur between both leaflets, and in the limiting case, it will lead to the single-leaflet structure. Therefore, if the double-leaflet structure is valid, we will observe areas with the inner leaflet covered partially by the outer leaflet. In addition, the dewetting behavior observed in ambient atmosphere is driven by a difference between interfacial energies. In fact, the interfacial energy between



**Figure 14.** Possible structures of AAPS bilayers: (14a) the double-leaflet structure, two superposed leaflets with molecules of a leaflet polymerizing with each other; (14b) the single-leaflet structure, one sheet of 2D polymerized molecules.

the first monolayer and the bilayer must be different from the interfacial energy between bilayers. In the case of the double-leaflet structure, both interfaces are similar, given by the chemistry and the density of tails, which are the same in the monolayer and in the bilayer. In contrast, in the single-leaflet structure, the density of tails at interfaces between bilayers is different from the one at the interface between the first monolayer and the bilayer. This undoubtedly leads to different interfacial energies. Thus, the single-leaflet structure correlates with the behavior of bilayers.

On the basis of energy considerations or formation mechanisms, configuration **14b** seems to be the most realistic structure. Unfortunately, we can not obtain a molecular resolution on these films with AFM to determine precisely the organization of the molecules in the bilayer. We hope that this work will give rise to more structural studies using more suitable techniques.

## Conclusion

In an attempt to improve our understanding of the formation and structure of AAPS on mica, a systematic study of deposition conditions and their effects is undertaken in this work:

Concerning the treatment in solution, the interaction of molecules with the surface of mica depends on the pH, as compared to the  $pK_{1/2}$ , of 10–11 that we have evaluated for the AAPS–mica interface. Only for pH's under 10 does the AAPS adsorb on the mica surface by electrostatic interactions via protonated terminal amines. In this deposition condition, we do not observe the formation of a structured layer of molecules.

In the case of vapor treatment, the film of AAPS is composed of a first monolayer and successive bilayers. To our knowledge,

it is the first time that such an organization in aminosiloxane films has been observed.

**Acknowledgment.** We are grateful to Dr. Isabelle Meunier and Mr. Jean-Mathieu Barbier for their participation in this work. Dr. Kheya Sengupta and Dr. Anne Charrier are thanked for their critical reading and helpful comments on the manuscript.

## References and Notes

- (1) Battistel, E.; Bianchi, D.; Rialdi, G. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 1483.
- (2) Schierbaum, K.; Weiss, T.; Van Velzen, E. T.; Engbersen, J.; Reinhoudt, D.; Cöpel, W. *Science* **1994**, *265*, 1413.
- (3) Kumar, A.; Biebuyck, H. A.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1994**, *10*, 1498.
- (4) Burtman, V.; Zelichenok, A.; Yakimov, A.; Yitzchaik, S. In *Semiconducting Polymers: Applications, Properties and Synthesis*; American Chemical Society: Washington, DC, 1999; Chapter 25.
- (5) Juvaste, H.; Iiskola, E. I.; Pakkanen, T. T. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *587*, 38.
- (6) Yang, Y.; Zhou, R.; Zhao, S.; Li, Q.; Zheng, X. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2003**, *192*, 303.
- (7) Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films*; Academic Press: Boston, MA, 1991.
- (8) Vandenbergh, E. T.; Bertelson, L.; Liedberg, B.; Uvdal, K.; Erlandsson, R.; Elwing, H.; Lundström, I. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *17*, 103.
- (9) Kallury, K. M. R.; Macdonald, P. M.; Thompson, M. *Langmuir* **1994**, *10*, 492.
- (10) Vrancken, K. C.; Possemiers, K.; Van der Voort, P.; Vansant, E. F. *Colloid Surf., A* **1995**, *98*, 235.
- (11) Horr, T. J.; Arora, P. S. *Colloid Surf., A* **1997**, *126*, 113.
- (12) Heiney, P. A.; Grüneberg, K.; Fang, J.; Dulcey, C.; Shashidhar, R. *Langmuir* **2000**, *16*, 2651.
- (13) White, L. D.; Tripp, C. P. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *232*, 400–407.
- (14) Ek, S.; Iiskola, E. I.; Niinistö, L.; Vaittinen, J.; Pakkanen, T. T.; Keränen, J.; Auroux, A. *Langmuir* **2003**, *19*, 10601–10609.
- (15) Zhang, F.; Srinivasan, M. P. *Langmuir* **2004**, *20*, 2309.



- (16) Bezanilla, M.; Manne, S.; Laney, D. E.; Lyubchenko, Y. L.; Hansma, H. G. *Langmuir* **1995**, *11*, 655–659.
- (17) Lyubchenko, Y. L.; Blankenship, R. E.; Gall, A. A.; Lindsay, S. M.; Thiemann, O.; Simpson, L.; Shlyakhtenko, L. S. *Scanning Microsc. Suppl.* **1996**, *10*, 97.
- (18) Tätté, T.; Saal, K.; Kink, I.; Kurg, A.; Lohmus, R.; Mäeorg, U.; Rahi, M.; Rinken, A.; Lohmus, A. *Surf. Sci.* **2003**, *532–535*, 1085–1091.
- (19) Diez-Perez, I.; Luna, M.; Teheran, F.; Ogletree, D. F.; Sanz, F.; Salmeron, M. *Langmuir* **2004**, *20*, 1284.
- (20) Crampton, N.; Bonass, W. A.; Kirkham, J.; Thomson, N. *Langmuir* **2005**, *21*, 7884–7891.
- (21) Crampton, N.; Bonass, W. A.; Kirkham, J.; Thomson, N. *Ultramicroscopy* **2006**, *106*, 765–770.
- (22) Chrisey, L. A.; Lee, G. U.; O'Ferral, E. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24* (15), 3031.
- (23) Ek, S.; Iiskola, E. I.; Niinistö, L. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 9650–9655.
- (24) Trens, P.; Denoyel, R.; Rouquero, J. *Langmuir* **1995**, *11*, 551–554.
- (25) Kim, S.; Christenson, H. K.; Curry, J. E. *Langmuir* **2002**, *18*, 2125–2129.
- (26) Schwartz, D. K.; Steinberg, S.; Israelachvili, J.; Zasadzinski, J. A. N. *Phys. Rev. Lett.* **1992**, *69*, 3354.
- (27) *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*; Perkin-Elmer Corporation: Waltham, MA, 1992.
- (28) Taton, K. S.; Guire, P. E. *Colloids Surf.* **2002**, *24*, 123.
- (29) Nefedoc, V. I.; Sergushin, N. P.; Salyn, Y. V.; Band, I. M.; Trzhaskovskaya, M. B. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1975**, *7*, 175.
- (30) Evan, S.; Pritchard, R. G.; Thomas, J. M. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1976**, *8*, 129.
- (31) Wagner, C. D.; Davis, L. E.; Zeller, M. V.; Taylor, J. A.; Raymond, R. H.; Gale, L. H. *Surf. Interface Anal.* **1978**, *3*, 341.
- (32) Seah, M. P.; Dench, W. A. *Surf. Interface Anal.* **1979**, *1*, 2.
- (33) Herder, P.; Vagberg, L.; Stenius, P. *Colloids Surf.* **1989**, *34*, 117.
- (34) Lambert, A. G.; Neivandt, D. J.; McAloney, R. A.; Davies, P. B. *Langmuir* **2000**, *16*, 8377–8382.
- (35) Holmes-Farley, S. R.; Bain, C. D.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1988**, *4*, 921–937.
- (36) Note: Acid–base titration of AAPS has been carried out and has given two values of  $pK_a$ , 8.5 and 10.2. These values correspond to the base/acid couples  $NH/NH_2^+$  of the secondary amine and  $NH_2/NH_3^+$  of the terminal primary amine of AAPS, respectively.
- (37) Maslova, M. V.; Gerasimova, L. G.; Forsling, W. *Colloid J.* **2004**, *6*, 322–328.
- (38) Sugimara, H.; Hozumi, A.; Kayemana, T.; Takai, O. *Surf. Interface Anal.* **2002**, *24*, 550.
- (39) Song, X.; Zhai, J.; Wang, Y.; Jiang, L. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *298*, 267.
- (40) Huang, N. P.; Michel, R.; Voros, J.; Textor, M.; Hofer, R.; Rossi, A.; Elbert, D. L.; Hubbel, J. A.; Spencer, N. D. *Langmuir* **2001**, *17*, 489.

JP903021E

# Adsorption of Thiolated Oligonucleotides on Gold Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study

N. Mourougou-Candoni,\* C. Naud, and F. Thibaudau\*

Groupe de Physique des Etats Condensés, Faculté de Luminy Case 901, Université de la Méditerranée, 13288 Marseille Cedex 09, France

Received May 31, 2002. In Final Form: September 16, 2002

Atomic force microscopy (AFM) was used to study oligonucleotide adsorption on a gold surface. Oligonucleotides are thiolated at the 5' end with  $\text{SH}(\text{CH}_2)_6$  to adsorb them specifically via a gold–sulfur linkage. Thanks to nanoscopic resolution of AFM, we have been able to measure the density of adsorbed molecules, varying experimental parameters. The adsorption kinetics of the oligonucleotides shows a two-step mechanism. The first step is a nonspecific adsorption of molecules. In the second one, these oligonucleotides diffuse and react with gold. This reaction depends on the structure of the surface (steps and/or reconstructions). The rate, which increases with temperature, leads to an activation energy of thiol dissociation on gold around 100 kJ/mol.

## Introduction

The immobilization of biomolecules on surfaces to develop materials biologically functionalized is of great technological interest. One of the applications is the DNA chip based on the capacity of single-stranded DNA molecules immobilized on a surface to recognize and to hybridize with their complementary strand. This method is widely used for the detection and characterization of genetic material for both clinical and environmental analysis.<sup>1,2</sup>

One critical aspect for the synthesis of such chips is the immobilization of oligonucleotides on the device surface. In fact, oligonucleotides must be available to hybridization without displaying rapid removal under hybridization or washing conditions. For this purpose, the immobilization is achieved by covalent coupling with the surface. It requires activation with a cross-linking reagent and/or modification of the oligonucleotide with a reactive group. Several studies have been carried out on  $\text{Si}/\text{SiO}_2$  surfaces,<sup>3–5</sup> on gold surfaces,<sup>6–12</sup> or on mica.<sup>13,14</sup> Our work

is related to the attachment of thiol-functionalized oligonucleotides on a gold substrate via gold–sulfur interactions. This linkage allows configurational freedom for oligonucleotides to form a double helix with the complementary molecule. Previously, Herne et al. studied adsorption of thiolated oligonucleotides on gold substrates.<sup>6–9</sup> They analyzed oligonucleotide-coupled surfaces using methods such as surface plasmon spectroscopy (SPR),<sup>6</sup> X-ray photoelectron spectroscopy (XPS),<sup>7</sup> neutron reflectivity,<sup>8</sup> or electrochemical quantitation.<sup>9</sup> However, they obtained only the average structure of the oligonucleotide assembly on the surface. In this paper, we present a direct visualization of the surface with a nanoscopic resolution using atomic force microscopy (AFM). Hence, we analyze the correlation between surface structure and adsorption of oligonucleotides. We investigate the influence on adsorption of oligonucleotide concentration, time of exposure, composition of the buffer, and temperature. Imaging with AFM is coupled with surface analysis by Auger electron spectroscopy (AES). Recently, Huang et al. conducted similar work on the adsorption of oligonucleotides on a gold surface using AFM.<sup>12</sup> However, even though experimental procedures are similar, we will show in this paper that we differ in the interpretation of the results.

## Materials and Methods

To observe oligonucleotide molecules of a few nanometer size, the gold substrate surface must exhibit atomically flat terraces. Therefore, we selected a protocol from previous works carried out by Klein et al.<sup>15</sup> on electron evaporation of gold on mica sheets in an UHV chamber. According to their investigation on the influence of evaporation parameters, it appears that the best condition to obtain large flat terraces is an evaporation rate of 1–2 Å/s for a substrate temperature of 460 °C, the film thickness being monitored by a quartz microbalance. This procedure leads to the typical Au(111) surface presented in Figure 1.

On a scale of 2.5 μm, we see terraces of 500 nm which are atomically flat (Figure 1a). We can determine the precise surface

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: candoni@gpec.univ-mrs.fr (N.M.-C.); thibaudau@gpec.univ-mrs.fr (F.T.).

(1) Beattie, K. L.; Beattie, W. G.; Meng, L.; Turner, S. L.; Coral-Vazquez, R.; Smith, D. D.; McIntyre, P. M.; Dao, D. D. *Clin. Chem.* **1995**, *41* (5), 700–706.

(2) Sayler, G. S.; Layton, A. C. *Annu. Rev. Microbiol.* **1990**, *44*, 625–648.

(3) Souteyrand, E.; Cloarec, J. P.; Martin, J. R.; Wilson, C.; Lawrence, I.; Mikkelsen, S.; Lawrence, M. F. *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 2980–2985.

(4) Cloarec, J. P.; Martin, J. R.; Polychronakos, C.; Lawrence, I.; Lawrence, M. F.; Souteyrand, E. *Sens. Actuators, B* **1999**, *58*, 394–398.

(5) Chrisey, L. A.; Lee, G. U.; O'Ferrall, C. E. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3031–3039.

(6) Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8916–8920.

(7) Levicky, R.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J.; Satija, S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9787–9792.

(8) Steel, A. B.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4670–4677.

(9) Peterlinz, A.; Georgiadis, M.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3401–3402.

(10) Kelley, S. O.; Barton, J. K.; Jackson, N. M.; McPherson, L. D.; Potter, A. B.; Spain, E. M.; Allen, M. J.; Hill, M. G. *Langmuir* **1998**, *14* (24), 6781–6784.

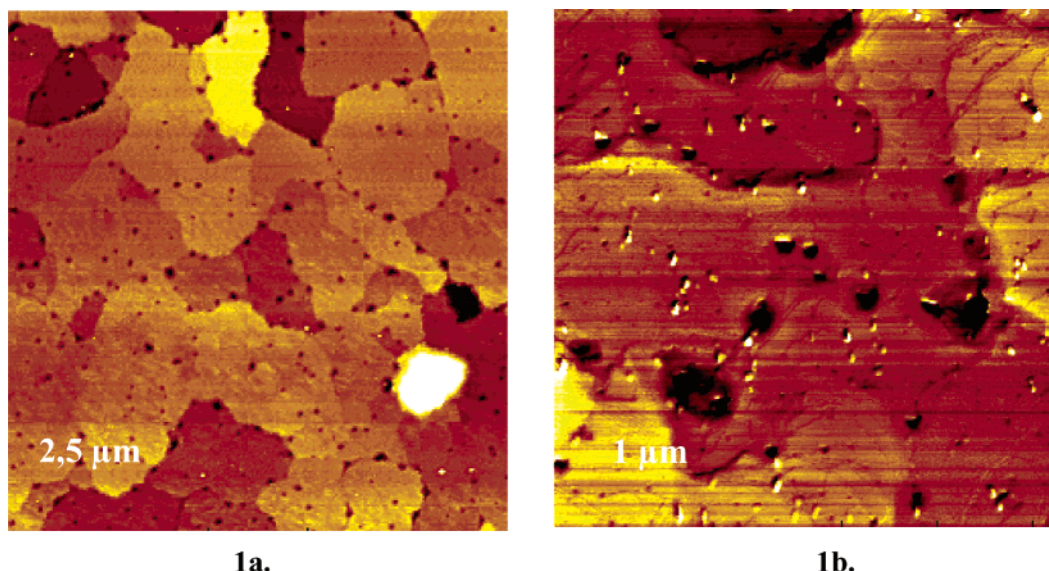
(11) Lisdat, F.; Ge, B.; Scheller, F. W. *Electrochem. Commun.* **1999**, *1*, 65–68.

(12) Huang, E.; Satjapipat, M.; Han, S.; Zhou, F. *Langmuir* **2001**, *17*, 1215–1224.

(13) Hansma, H. G.; Revenko, I.; Kerry, K.; Laney, D. E. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24* (4), 713–720.

(14) Shlyakhtenko, L. S.; Gall, A. A.; Weimer, J. J.; Hawn, D. D.; Lyubchenko, Y. L. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 568–576.

(15) Klein, H.; Blanc, W.; Pierrisnard, R.; Fauquet, C.; Dumas, Ph. *Eur. Phys. J. B* **2000**, *14*, 371–376.



**Figure 1.** AFM images in the contact mode of a Au(111) surface obtained by electron evaporation of gold on mica sheets in a UHV chamber at an evaporation rate of  $1\text{--}2 \text{ \AA/s}$  for a substrate temperature of  $460 \text{ }^\circ\text{C}$ : (a) ( $2.5 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$ ) atomically flat terraces of 500 nm, (b) ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ) presence of atomic steps.

structure with the  $1 \mu\text{m}$  wide picture shown in Figure 1b where atomic steps are visible on the edge of the terraces.

We studied oligonucleotides of 25 bases, 5'-AGA CAT CAT-CAT GCA AAG AAT CGA C-3'. Oligonucleotides were thiolated at the 5' end with  $\text{SH}(\text{CH}_2)_6\text{-5'}$ . They were purchased from Eurogentec where they were synthesized by standard phosphoramidite chemistry and purified by inverse-phase chromatography. Solutions of oligonucleotide were prepared at desired concentrations in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) (pH 6.7) or pure water (Milli-Q) (pH 7).

Prior to use, all the dishes and instruments were carefully cleaned in a hot solution ( $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) containing 15%  $\text{NH}_3$  and 15%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in pure water ( $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  resistivity) for 1/2 h. Then, they were extensively rinsed with pure water and dried under a nitrogen flow. All chemicals were commercial grades of highest purity.

Oligonucleotide deposition on fresh gold substrates was performed by immersing them for a specific amount of time in the solution of oligonucleotide at a given concentration. Then, samples were removed, thoroughly rinsed with pure water, and dried under a stream of nitrogen.

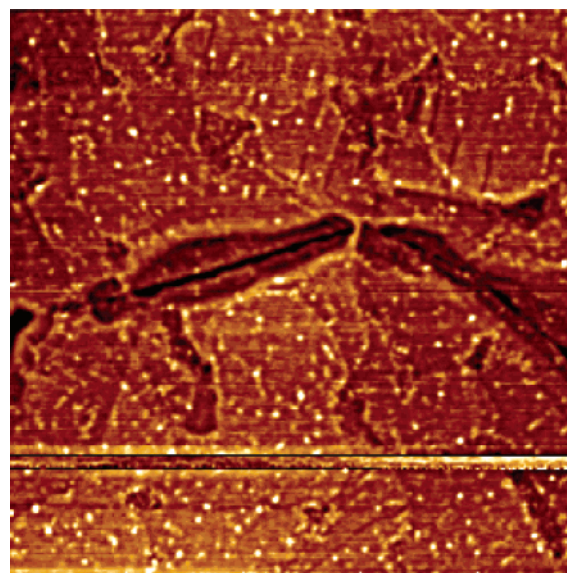
AFM experiments were performed in an ambient atmosphere, typically  $20\text{--}25 \text{ }^\circ\text{C}$  and 30–35% humidity, using generally the intermittent contact mode (also known as the "tapping mode") at a scan frequency of  $1\text{--}2 \text{ Hz}$  and the contact mode when noted. Surface topography was obtained with uncoated silicon cantilever tips of  $\sim 15 \text{ nm}$  apex diameter. The AFM images presented here were processed with flatten and contrast enhancement processing from Nanoscope III software. We completed our investigations by AES.

## Results and Discussion

Our aim is to explore the adsorption of oligonucleotides on a gold surface at the nanoscopic level. For this purpose, we have studied surfaces using AFM, a technique of surface imaging, coupled with AES, a method of chemical analysis. We have also investigated the influence of various parameters on adsorption. Previous to carrying out these experiments with oligonucleotides, we verified that exposing the surface to water or  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) does not modify the gold surfaces.

**Influence of Exposure Time on Adsorption.** The exposure time has been explored from 1 s to 30 min by immersing a Au(111) substrate in a 5 nM solution of oligonucleotide in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M).

Figure 2 shows a  $1 \mu\text{m}$  wide picture of a surface exposed for a few seconds and observed with the tapping mode of



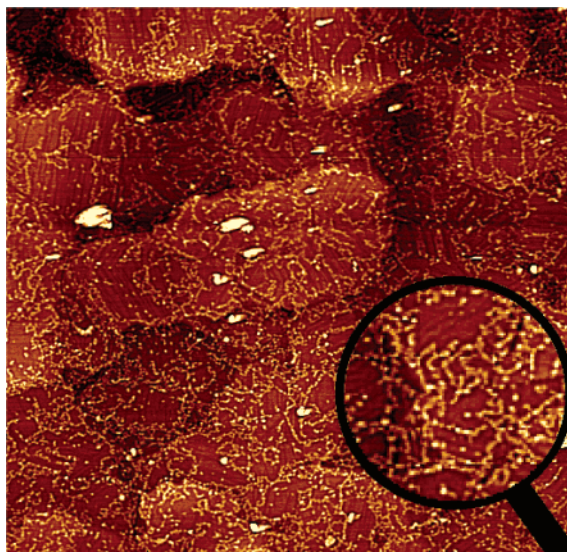
**Figure 2.** AFM image ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ) of a surface exposed to an oligonucleotide solution (5 nM) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) for a few seconds. Molecules appear like white bumps with a height of  $\sim 1 \text{ nm}$  and a diameter of 15 nm.

AFM. It must be pointed out that this surface is particularly slightly covered compared to others submitted to the same experiment. Hence, we see white bumps with a height of  $\sim 1 \text{ nm}$  and a diameter of 15 nm which we attribute to oligonucleotides adsorbed on the surface.

After 10 min of immersion with this sample, the surface becomes more covered whereas oligonucleotides are still well-distinguishable (Figure 3). In Figure 3, adsorption is inhomogeneous since the molecules are arranged like filaments which seem to follow lines displayed by the surface. Sometimes these lines reproduce the symmetry of the Au(111) surface (see the magnified area). We must emphasize that molecules adsorbed on these lines seem to be connected together because they are close-packed and the lateral resolution of the AFM is limited by the apex diameter of the tip of  $\sim 15 \text{ nm}$ .

As the density of adsorbed molecules fluctuates from one sample to another, we have determined the adsorption kinetics of oligonucleotides from experiments carried out





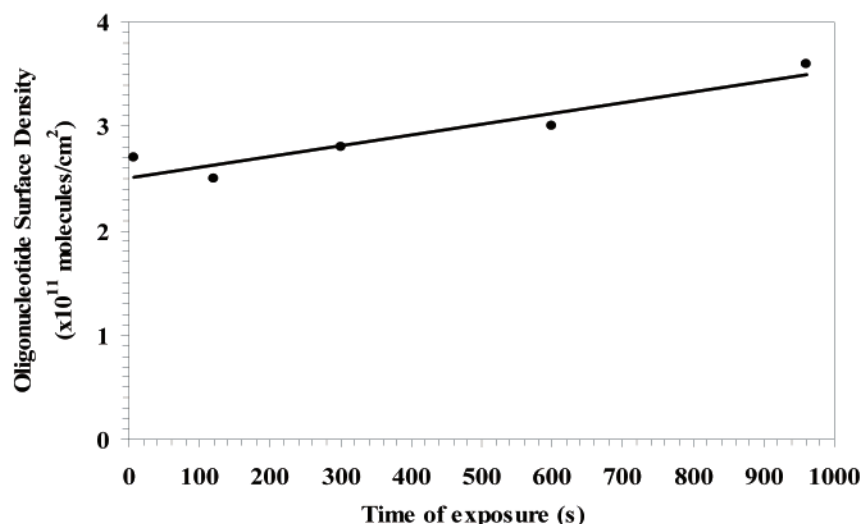
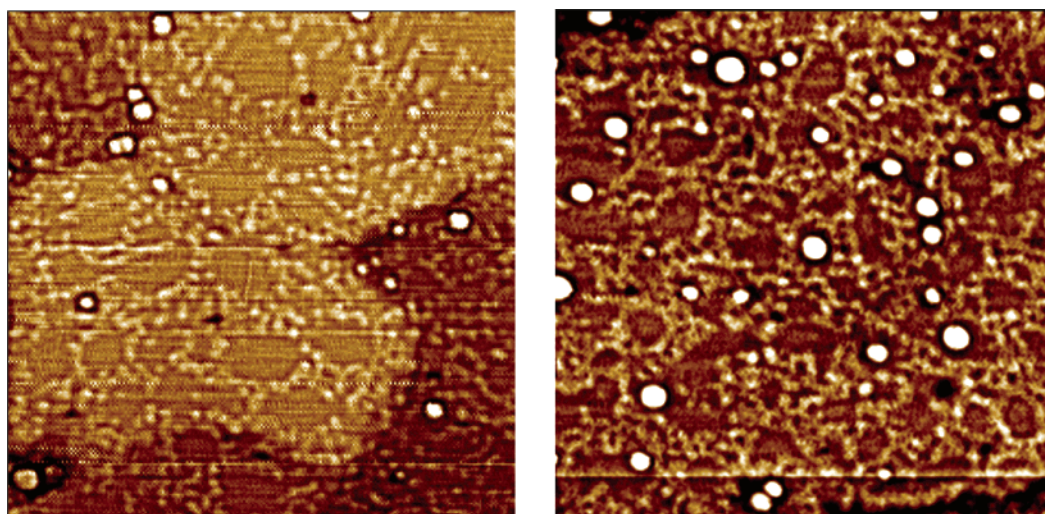
**Figure 3.** AFM image ( $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ ) of a surface exposed to a solution of oligonucleotide (5 nM) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) for 10 min. Molecules form a filamentous arrangement following the symmetry of the Au(111) surface (zoom inset).

on the same sample. Figure 4 displays the time dependence

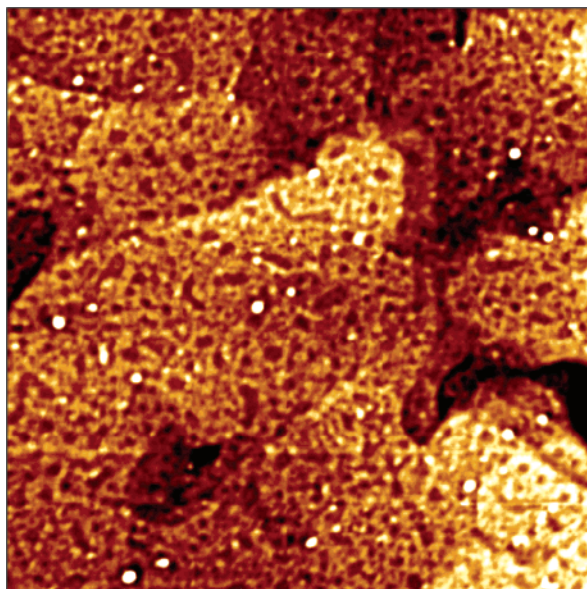
of the density of molecules measured on AFM images. The DNA density data are inferred from the visual examination of the AFM images. Molecules were counted by each author of this paper, and the only guideline was to not count too small bumps. In practice, this leads to more than 95% of the bumps being counted for a coverage in the  $10^{11}$  molecules/ $\text{cm}^2$  range. Although the criteria used to identify the molecules and count them were fuzzy, the counting deviation between the authors was generally less than 10%.

Obviously, we note that adsorption proceeds in two steps, the first one being much more rapid than the second one. During the second step, adsorption increases with a rate of  $10^8$  (molecules/ $\text{cm}^2$ )/s. The same experiment repeated with several samples gives a similar curve even though surface density at the end of the first stage can vary from  $5 \times 10^{10}$  to  $5 \times 10^{11}$  molecules/ $\text{cm}^2$  according to the sample.

According to AFM images, adsorbed molecules appear with a height of 1 nm (Figure 2). On one hand, oligonucleotides of 25 bases adsorbed on the gold surface through the thiol group and stretched to full length are higher than 16 nm according to SPR measurements realized by Herne et al.<sup>6</sup> On the other hand, if the same oligonucleotide displays segments which are isotopically distributed in space, these authors estimated that the



**Figure 4.** Au(111) surface exposed to an oligonucleotide solution at a concentration of 5 nM in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M): AFM images ( $0.5\ \mu\text{m} \times 0.5\ \mu\text{m}$ ) for 120 s on the left and 960 s on the right (large white spots correspond to clusters which were present on the bare gold surface before immersion) and oligonucleotide surface density as a function of the exposure time.



**Figure 5.** AFM image ( $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ ) of a Au(111) surface exposed to an oligonucleotide solution (40 nM) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) for 10 min. A film displaying holes covers the surface.

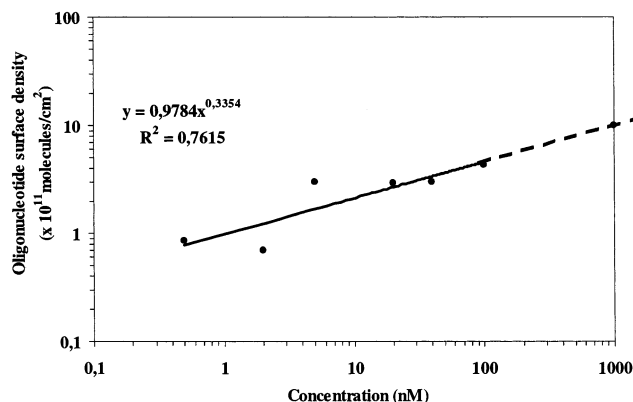
component of the radius of gyration along the direction perpendicular to the surface is on the order of  $R_{gz} \approx 1.1 \pm 0.1\ \text{nm}$ .<sup>8</sup> Thus, it appears that molecules observed by AFM are rather curled up in a ball than extended on the surface. This globulate conformation of 25-base oligonucleotides was also described by Hansma et al. with AFM.<sup>13</sup> Furthermore, molecules seem to adsorb preferentially at the structure of the surface due to the presence of steps as displayed by the zoom inset of Figure 3 and/or in reconstruction areas.<sup>16</sup> Hence, varying densities of steps and/or reconstructed area can explain the difference of reactivity between samples (Au reconstruction is known to be unstable when it is exposed to air).

**Influence of Oligonucleotide Concentration on Adsorption.** The influence of oligonucleotide concentration has been studied by placing substrates in solutions of oligonucleotide in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) at various concentrations.

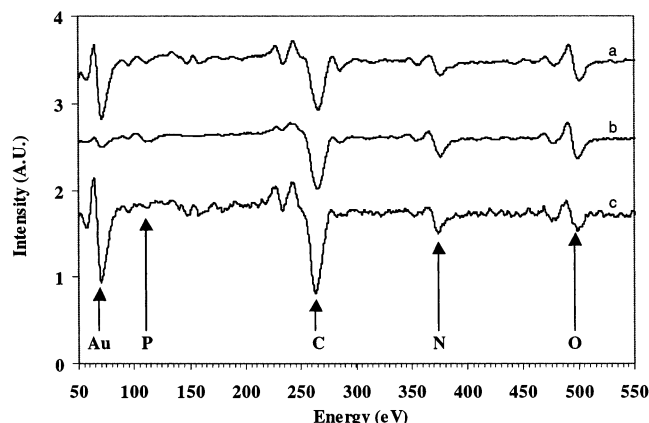
After 10 min of immersion, AFM images show that the surface density of the molecules changes with concentration. Figures 3 and 5 display two limiting cases. For a high density of molecules, the surface appears covered by a film presenting holes. In fact, molecules are so closely juxtaposed that AFM is not able to resolve them. However, we can estimate that the density is in the  $10^{12}$  molecules/ $\text{cm}^2$  range.

Figure 6 displays the behavior of the molecule surface density with concentration in the density range where we are able to count them. The adsorption increases with concentration but does not scale linearly. If we extrapolate from the behavior of the density of molecules at a concentration of  $1\ \mu\text{M}$ , we obtain a value in the  $10^{12}$  molecules/ $\text{cm}^2$  range. This is in agreement with our AFM images and with the value measured by Herne et al. using electrochemical quantitation.<sup>9</sup>

To confirm the presence of oligonucleotides, we have carried out AES analysis. Because AES is less sensitive than AFM, experiments were performed on highly covered surfaces. Parts a and b of Figure 7 show AES spectra obtained on substrates soaked in thiolated oligonucleotide solutions at 100 nM and  $1\ \mu\text{M}$  for 1 h. The presence of



**Figure 6.** Oligonucleotide surface density as a function of concentration for a Au(111) surface immersed in an oligonucleotide solution in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) for 10 min.



**Figure 7.** AES analysis of a Au(111) surface soaked in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) solutions containing thiolated oligonucleotide at concentrations of 100 nM (a) and  $1\ \mu\text{M}$  (b) for 1 h and nonthiolated oligonucleotide at a concentration of  $1\ \mu\text{M}$  for 2 h (c). The presence of oligonucleotides on the surface is displayed by nitrogen and oxygen peaks.

nitrogen and oxygen peaks corresponds to a large amount of oligonucleotides on the surface. We have calculated the oligonucleotide film thickness from the attenuation of the substrate gold peak<sup>17</sup> and obtain 1 nm for 100 nM and 3 nm for  $1\ \mu\text{M}$ . These values lead to surface densities of  $4 \times 10^{12}$  molecules/ $\text{cm}^2$  for 100 nM and  $12 \times 10^{12}$  molecules/ $\text{cm}^2$  for  $1\ \mu\text{M}$  assuming an oligonucleotide volume of  $25\ \text{nm}^3$  ( $25\ \text{nm}^3$  is half the double-stranded DNA volume). This is in agreement with a previous determination realized by Herne et al. using electrochemical quantitation.<sup>9</sup>

Finally all these densities we observe are drastically different from the values obtained by Huang et al.<sup>12</sup> With a gold surface similar to ours and concentrations of 5 and 500 nM, they estimated from their AFM images a density in the  $10^9$  molecules/ $\text{cm}^2$  range. In fact, they consider as oligonucleotide molecules some large lumps appearing with a diameter of 26–40 nm which we would attribute to impurities as those visible in Figure 3 (or packs of oligonucleotides). However, their AFM images display

(16) Chambliss, D. D.; Wilson, R. J.; Chiang, S. *J. Vac. Sci. Technol.*, B **1991**, 9, 933.

(17) Film thicknesses have been calculated using a homogeneous layer model. For a layer thickness  $d$ , the intensity of the substrate Auger peak is given by  $I(d) = I(0) e^{-d/\lambda}$ , where  $\lambda$  is the inelastic mean free path (IMFP) of the substrate Auger electron in the layer. The DNA thickness is then evaluated with  $d = \lambda \ln(I_0/I)$ , where  $I_0$  is the Au Auger electron intensity peak without a DNA layer and  $I$  that with a DNA layer.  $\lambda$  is calculated from the organic compound IMFP formula given by Seah and Deanech: Seah, M. P.; Deanech, W. A. *Surf. Interface Anal.* **1979**, 1, 2–11.



small features they do not take into account and that we assign to oligonucleotides.

**Specificity of the Adsorption.** During contact between the surface and oligonucleotide, the oligonucleotide adsorbs either specifically via gold–sulfur linkage or nonspecifically via nitrogen interactions of nucleotide side chains. We have studied nonspecific adsorption with nonthiolated oligonucleotides.

Substrates have been soaked in a solution of nonthiolated oligonucleotide in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) at a concentration of 1  $\mu\text{M}$  for 2 h. AES analysis shows the presence of a large amount of oligonucleotides (Figure 7c) in agreement with a previous study by Herne et al. using XPS.<sup>7</sup> However, AFM images do not display bumps for nonthiolated oligonucleotides. We conclude that bumps observed with thiolated oligonucleotides are due to the linkage through thiol and that nonspecifically adsorbed molecules are not visible with AFM. This is probably due to the diffusion of nonattached molecules on the surface, which is more rapid than the scanning speed of AFM.

**Mechanism of Adsorption.** Our results show that a large amount of oligonucleotides adsorb rapidly. For example, specific adsorption results in  $10^{11}$  molecules/ $\text{cm}^2$  from a solution of 5 nM after an immersion of 10 s (Figure 4). If we consider that molecules reach the surface by diffusion (with a diffusion coefficient<sup>18</sup> of  $(6-7) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ), a surface density smaller than  $10^{10}$  molecules/ $\text{cm}^2$  would be obtained. Hence, in the first step of adsorption, measured surface densities cannot be reached taking into account solely the diffusion phenomenon. Consequently, it must occur during dipping of the substrate when this dipping creates an eddy in the solution. As molecules do not have enough time to react with the substrate during dipping, they adsorb essentially nonspecifically, and we think that they reach their equilibrium density in a few seconds. After the surface is removed from the solution, these molecules diffuse and react with the surface. According to our images, this reaction is promoted by steps or/and reconstructions of the surface. Thus, our imaging being carried out tens of minutes after the adsorption experiments, all of the molecules have enough time to react with the surface. Hence, despite the fact that AFM does not visualize nonspecifically adsorbed molecules, the density of molecules measured by AFM in the first step of Figure 4 corresponds to the equilibrium density of nonspecifically adsorbed molecules during dipping. Considering this hypothesis, the behavior of adsorption kinetics is consistent with a two-step mechanism. Indeed, for longer times, the increase of the measured density with time reflects the rate of immobilization of nonspecifically adsorbed oligonucleotides which diffuse on the surface during its exposure to the solution. In our experiment, the kinetic factor is  $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  [ $10^8$  (molecules/ $\text{cm}^2$ )/s]/( $2.5 \times 10^{11}$  molecules/ $\text{cm}^2$ ). This kinetic factor is consistent with the one measured by Lavrich et al. for chemisorption of alkanethiol on a gold surface.<sup>19</sup> Considering that this factor is around  $(10^{13}-10^{14}) \times e^{-E/RT} \text{ s}^{-1}$ , we obtain an activation energy  $E$  around 100 kJ/mol. This is in the range of the activation energy of a surface molecule dissociation. This may correspond to the reaction activation energy of a thiol group with gold. In this case, the reaction rate can depend on the structure of the surface as displayed by AFM images.

**Influence of the Composition and Temperature of the Buffer on Adsorption.** The composition and temperature of the buffer containing oligonucleotides (1  $\mu\text{M}$ ) have also been investigated. At room temperature, AFM images show a very low adsorption in pure water (the density is lower than  $10^{10}$  molecules/ $\text{cm}^2$ ). This phenomenon was also observed by Herne et al.<sup>7</sup> with XPS. The authors explained it by intermolecular electrostatic repulsion between neighboring strands of oligonucleotides which bear negative charges on their phosphate backbone. Therefore, they suppose that repulsion can be minimized under high ionic strength conditions because the charged strands are better electrostatically shielded, allowing high surface coverage. However, in our experiments, adsorption in water is activated at high temperature and AFM images display a large density of molecules after 1 h of immersion at 60 °C (higher than  $10^{12}$  molecules/ $\text{cm}^2$ ). For repulsive electrostatic interaction between molecules, the energy drastically increases with the density of molecules on the surface (nonspecifically and specifically adsorbed). Consequently, the total density of molecules is limited and cannot drastically increase with temperature. Then, our results suggest that the electrostatic effect is not the cause of adsorption inhibition in water. We think that this is due to another phenomenon which does not affect the possibility of a large amount of molecules on the surface (specifically or nonspecifically adsorbed), as the electrostatic effect would involve. In the framework of our adsorption model, the density of specifically adsorbed molecules is proportional to the equilibrium density of nonspecifically adsorbed ones and to the kinetic factor for specific adsorption. Our results are consistent with a low equilibrium density of nonspecifically adsorbed molecules in water. This leads on one hand to a low specific adsorption at room temperature, and on the other hand to an increase of the adsorption at high temperature due to the increase of the kinetic factor. Indeed, the activation energy that we have calculated gives a kinetic factor for specific reaction 100-fold higher at 60 °C than at room temperature.

## Conclusion

The aim of the present work is to study the adsorption process of oligonucleotides on gold surfaces. A direct visualization of oligonucleotide-coupled surfaces is obtained with a nanoscopic resolution using AFM, and chemical analyses are performed with AES. We show that compared to AES, which detects all of the molecules present on the surface, AFM visualizes only specifically adsorbed molecules. These appear as white bumps of  $\sim 1$  nm height that we can count on the gold surface. The adsorption kinetics shows a two-step mechanism. The first instantaneous adsorption concerns essentially oligonucleotides which adsorb nonspecifically during dipping of the substrate, reaching their equilibrium density. Then, their reaction with gold is promoted by steps and/or reconstructions of the surface and is achieved for all of the molecules before AFM imaging. The increase of density observed in the second step concerns oligonucleotides adsorbing nonspecifically from solution and reacting with the surface by diffusion. This reaction depends on the structure of the surface, and its kinetic factor increases with temperature.

LA026021J

(18) Tinland, B.; Pluen, A.; Sturm, J.; Weill, G. *Macromolecules* **1997**, *30*, 5763–5765.

(19) Lavrich, D. J.; Wetterer, S. M.; Bernasek, S. L.; Scoles, G. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3456–3465.



## Chapitre 2

### Contacts atomiques et moléculaires

Dans ce second chapitre, je décris l'étude d'une nanojonction d'or créée grâce à un dispositif de jonction brisée contrôlée mécaniquement (MCBJ). Cette étude est réalisée en parallèle avec celle, déjà commencée dans l'équipe, qui concerne une jonction brisée basée sur la technique du microscope à effet tunnel (STM-BJ). Dans les deux systèmes, une nanojonction de section atomique est formée à partir d'une constriction d'or qui est étirée jusqu'à la rupture, formant deux contacts atomiques. Nous nous intéressons alors à la dynamique de cette rupture à travers des mesures répétées de la conductance au cours de l'élongation. Ainsi, nous expliquons les contraintes agissant sur la jonction en se basant sur les résultats obtenus avec le STM-BJ et la MCBJ. Cette dernière présente l'avantage d'atteindre des vitesses d'étirement faibles grâce à sa stabilité mécanique. Enfin, un des objectifs étant de fixer une molécule entre les deux contacts atomiques, cette étude de la jonction Au-Au contribuera donc à la compréhension de la jonction Au-molécule.

La mise au point du dispositif a été réalisée en collaboration avec Igor Makarenko de l'Institut Ioffe (St Petersburg). Elle a intéressé plusieurs étudiants dont Sabrina Homri, étudiante en M2 recherche, Ugo Baudez, étudiant d'IUT et Thomas Léoni qui a réalisé sa thèse sur le STM-BJ (2009). Enfin, les résultats que je présente sur la MBCJ sont obtenus par Monzer Alwan, étudiant en thèse depuis 2009.



## Introduction

Dans ce projet, nous nous intéressons à une constriction d'or de section atomique dans le but de créer des contacts ponctuels. L'idée est, à terme, de mesurer la conductance d'une molécule unique qui refléterait les propriétés physico-chimiques de la molécule, de façon plus rigoureuse que des mesures moyennes sur une grande population de molécules dans des configurations probablement proches. Pour cela, des techniques de lithographie à faisceau d'électrons<sup>1</sup> ou par électrochimie<sup>2</sup> permettent de disposer des électrodes conductrices sur un substrat solide, que les molécules viennent ponter. Dans ce cas, le gap fixe entre les électrodes doit être de la taille de la molécule. De plus, il est difficile de savoir combien de molécules sont effectivement présentes. D'où l'idée d'une technique à gap variable car en augmentant le gap, le nombre de molécules pontant les deux électrodes va progressivement diminuer jusqu'à atteindre la molécule unique, puis le régime tunnel.<sup>3</sup> Dans ce principe, un premier système développé au laboratoire est basé sur la technique du microscope à effet tunnel (STM-BJ).<sup>4</sup> L'approche consiste à créer une constriction en venant contacter une pointe STM en or sur une surface en or. Ainsi, on étire la constriction en séparant la pointe de la surface jusqu'à une jonction monoatomique qui, une fois brisée, peut connecter une molécule unique parmi celles présentes dans le milieu. Cependant cette démarche a ses limites, en particulier pour l'étude des molécules. En effet, à température ambiante, il est extrêmement difficile de stabiliser la pointe au-dessus de la molécule assez longtemps pour en explorer toutes les propriétés. Une solution est de travailler à basse température ce qui améliore remarquablement la stabilité. La mise en place au laboratoire d'un STM/AFM pouvant opérer jusqu'à 4 Kelvin permettra d'aborder ces études. Cependant, les études à température ambiante, à l'air ou en milieu liquide, gardent tout leur intérêt et l'objectif est de créer un dispositif complémentaire au STM à 4K.

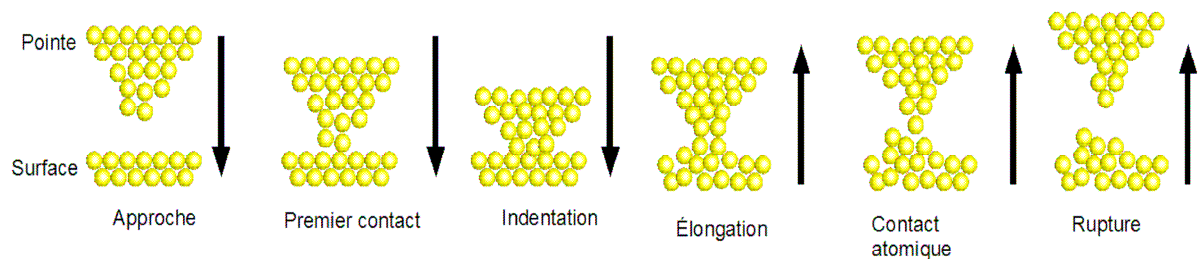
L'idée est alors d'utiliser un système plus rigide que le STM-BJ, mais toujours à géométrie variable. Une solution est la jonction brisée contrôlée mécaniquement (MCBJ) dont le principe général a été introduit par Moreland et Ekin en 1985.<sup>5</sup> Le principe consiste à étirer un fil d'or, collé en deux points rapprochés sur une plaque, en fléchissant cette dernière jusqu'à rupture du fil, créant deux contacts pour fixer une molécule. Comparé à un STM-BJ, la boucle mécanique correspond à la distance entre les points de fixation du fil d'or. Elle est donc extrêmement réduite ce qui explique de très faibles dérives mécaniques de l'ordre du pm par heure.<sup>6</sup> Par conséquent, on peut stabiliser une structure pendant de longues durées et augmenter ainsi le rapport signal sur bruit des mesures. De plus, cette technique permet de réduire la vitesse d'élongation, ce qui améliore la stabilité notamment pour des études sur les molécules tout en modifiant peu la mesure de la conductance. En fait, la vitesse d'élongation dépend du rapport  $r$  entre la flèche de la plaque et l'élongation du fil qui est de l'ordre de  $10^{-2}$ .<sup>6</sup> On peut encore augmenter ce rapport en fabriquant un pont métallique sur la surface par lithographie à faisceau d'électrons<sup>7</sup> avec des rapports  $r$  aussi faibles que  $10^{-5}$ .<sup>8-11</sup> Le faible rapport limite toutefois l'échelle d'élongation ce qui est un inconvénient lorsqu'on veut répéter des expériences de rupture et de connexion des contacts, qui nécessitent des flexions de la plaque de l'ordre de  $100\mu\text{m}$ .

Nous avons développé un dispositif MCBJ avec un support non lithographié à base d'un fil d'Au. Notre but est de comprendre les contraintes qui agissent sur la jonction de section di- ou mono-atomique lors de la rupture. Ceci contribuera à l'étude ultérieure de la jonction Au-molécule. Pour cela, nous menons une étude statistique sur des milliers d'expériences de rupture de la jonction Au-Au que nous comparons aux résultats obtenus avec le STM-BJ, la MCBJ apportant la possibilité de varier la vitesse d'élongation.

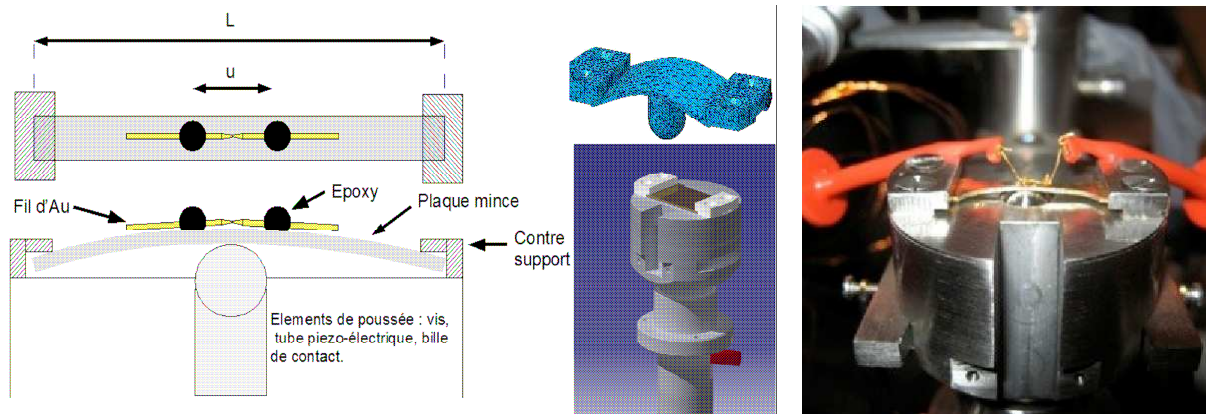
## I. Formation de la nanojonction d'Au

### I.1. Principes

Nous avons utilisé deux techniques pour créer la jonction d'Au. Le principe du STM-BJ, qui est bien décrit dans la thèse de Thomas Léoni,<sup>4</sup> consiste à indenter une surface d'Au avec une pointe en Au. Puis on rétracte la pointe, ce qui étire la jonction formée lors de l'indentation jusqu'à ce qu'elle rompe donnant deux électrodes nanométriques (figure 1). Dans la MCBJ, les deux électrodes sont solidaires d'un support souple qui est courbé pour contrôler la rupture en ajustant leur séparation (figure 2).<sup>6</sup> Dans les deux systèmes, tout en étirant la jonction, on mesure le courant à travers elle pour en calculer sa conductance.



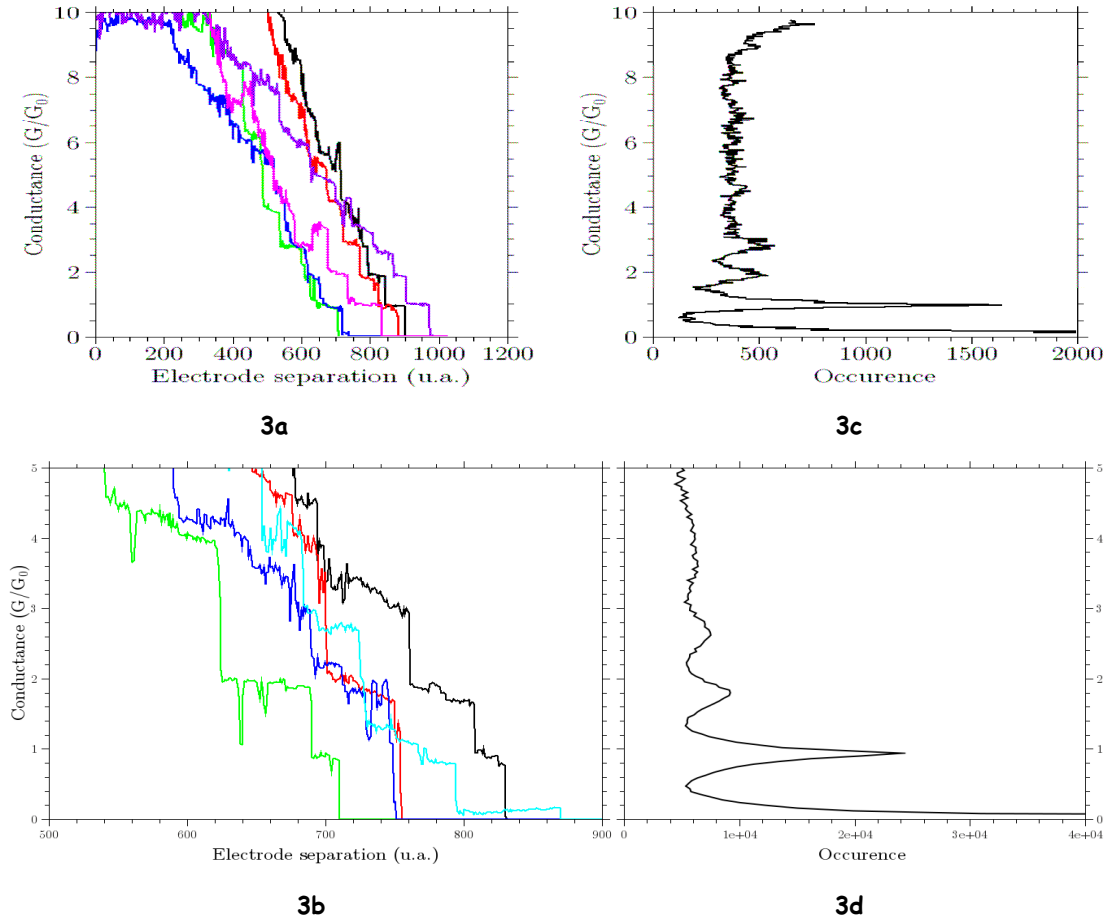
**Figure 1.** Principe du STM-BJ développé au laboratoire:<sup>4</sup> La pointe du STM est amenée, de manière contrôlée, au contact de la surface puis retirée. La surface du contact s'amincit pour former une nanojonction que l'on étire jusqu'à la rupture.



**Figure 2.** Principaux éléments de la MCBJ développée au laboratoire:<sup>6</sup> Un fil d'Au d'une centaine de microns de diamètre est fixé par deux gouttes d'époxy séparées millimétriquement sur une plaque de bronze phosphoreux, connu pour ces qualités d'élasticité. Cette plaque est elle-même montée dans un système de flexion trois points utilisant une céramique piézoélectrique en série avec une vis. La déformation de la plaque par le système de flexion va mettre le fil en traction. On peut poursuivre cette traction jusqu'à briser le fil, préalablement affaibli entre les points de colle. On obtient alors deux électrodes d'Au nanométriques par leur séparation et par leur taille. On module la distance entre les deux électrodes en modulant la tension électrique appliquée au piézoélectrique. Pour cela, on se base sur un effet de démultiplication entre la variation de la flèche de la plaque élastique et la variation beaucoup plus faible de la distance inter-électrodes.

## I.2. Transport balistique

Au cours de l'élongation de la jonction d'Au dans le STM-BJ et la MCBJ, on passe du contact au régime tunnel en amincissant la jonction d'Au jusqu'à une section de dimension atomique sur une longueur de quelques atomes. Cette longueur étant inférieure au libre parcours moyen des électrons, ils ne diffusent plus sur les défauts (impuretés, joints de grain...) du cristal. On se trouve donc dans une situation de transport balistique des électrons où la conductance prend une valeur qui ne dépend plus de la longueur du conducteur mais de sa section. Ainsi, la conductance est constante lors de l'élongation tant que la section de la constriction ne varie pas et on peut considérer que le courant est transporté par un nombre fini de canaux, un seul dans le cas extrême.<sup>12-13</sup> Par conséquent, des plateaux de conductance à des valeurs bien déterminées et des sauts sont observés (figures 3a et 3b).<sup>14-15</sup>



**Figures 3.** Expériences d'élongation répétées avec le STM-BJ<sup>4</sup> (3a et 3c) et la MCBJ<sup>6</sup> (3b et 3d): **3a et 3b)** La mesure de la conductance  $G(z)$  en fonction de l'élongation ( $z$ ) montre que la conductance décroît jusqu'à ce que la jonction d'Au se rompe. Les courbes mettent en évidence la quantification de la conductance en multiples entiers de  $G_0 = 2e^2/h$ . La vitesse d'élongation des électrodes est de l'ordre de  $100\text{nm.s}^{-1}$  dans les deux techniques. L'axe des abscisses est en unité arbitraire, proportionnelle à l'élongation.

**3c et 3d)** Histogrammes des conductances moyennes des plateaux: Thomas Léoni a développé, pour le STM-BJ, un automate d'analyse capable d'isoler les plateaux de conductance en les repérant par les variations abruptes de la conductance qui les précèdent et les succèdent. Ainsi, chaque plateau détecté est compté et représenté sur l'histogramme à sa valeur moyenne de conductance (3c).<sup>19</sup> Nous utilisons le même automate d'analyse pour les plateaux obtenus avec la MCBJ, ce qui donne des résultats comparables (3d).<sup>6</sup>

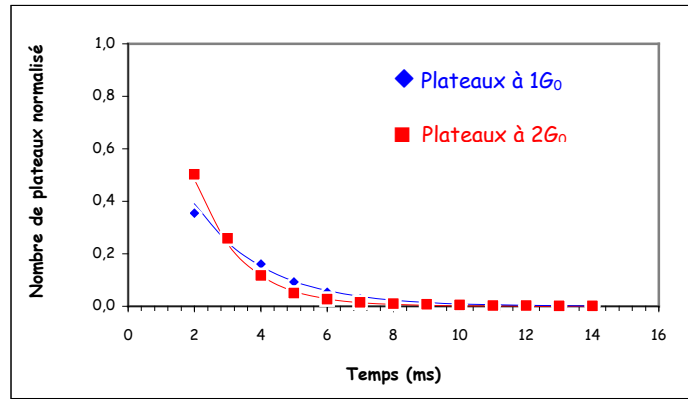
Ces plateaux apparaissent à des valeurs de conductance multiples du quantum de conductance de Landauer  $G_0 = 2e^2/h$ , où  $h$  est la constante de Planck et  $e$  la charge de l'électron.<sup>16</sup> En fait dans le cas de l'Au, métal 5d monovalent, c'est essentiellement la bande s qui contribue au transport.<sup>17</sup> Seule cette orbitale est alors responsable du transport dans un fil d'Au de section monoatomique. Ainsi on approche du cas de figure idéal 1 canal = 1 quantum de conductance. Dans le contact dont la section est composée de 2 atomes, la conductance est alors de  $2G_0$  et, de  $1G_0$  pour la section d'1 atome.<sup>18</sup> Puis la conductance diminue jusqu'au régime tunnel (conductance de l'ordre  $10^{-5} \times G_0$ ). Cette diminution de la section s'accompagne d'une réorganisation des atomes qui la composent, ce qui provoque les sauts observés entre les plateaux.

Nos systèmes permettant de répéter des milliers de fois la rupture et la connexion sur une même jonction, nous réalisons des analyses statistiques sur les milliers de courbes d'élongation obtenues, sans aucun tri, ni aucun arbitraire. De plus Thomas Léoni a développé, pour le STM-BJ, un automate d'analyse élaboré capable d'isoler les plateaux de conductance, dont le principe est décrit dans l'article à la fin de ce chapitre.<sup>19</sup> Nous appliquons cette technique d'analyse des données aux résultats de la MCBJ et les histogrammes obtenus ont la même apparence qu'avec le STM-BJ (figures 3c et 3d). Ces histogrammes, permettant de caractériser les plateaux par leur durée de vie et leur longueur, informent sur le mécanisme de rupture commun aux deux techniques.

## II. Rupture de la nanojonction d'Au

### II.1. Durée de vie et longueur des plateaux

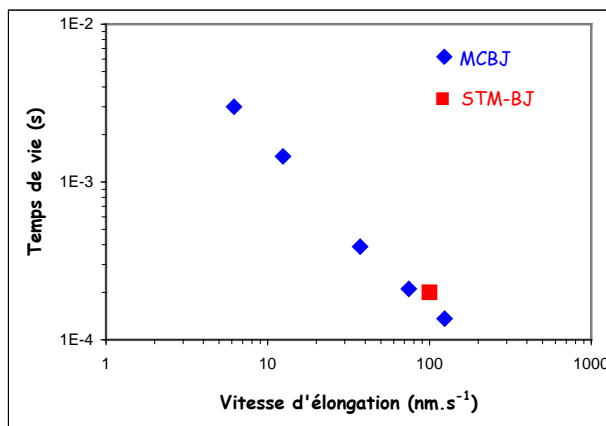
La durée de vie des plateaux à  $1G_0$  et à  $2G_0$  renseigne sur la stabilité de la jonction, respectivement mono et diatomique, et donc sur le processus de rupture. Cette durée de vie est déterminée à partir de la longueur des plateaux et de la vitesse d'élongation. Les histogrammes de ces durées de vie suivent une loi de décroissance exponentielle (figure 4) qui correspond à la probabilité  $P(t)$  d'observer une jonction durant un intervalle de temps  $t$ .<sup>20-21</sup> Si la jonction n'est pas rompue à l'instant  $t + dt$ , cela signifie qu'elle existait à l'instant  $t$  et ne s'est donc pas rompue durant l'intervalle  $dt$ . D'où  $P(t + dt) = P(t)(1 - p)$  avec  $p$ , la probabilité de rompre la jonction pendant l'intervalle de temps  $dt$ . Cette probabilité  $p$  n'étant proportionnelle qu'à  $dt$  (processus markovien), on a  $p = dt/\tau$ . En fixant l'origine des temps  $t$  au moment où la jonction est créée, on en déduit donc que  $P(t) = \exp(-t/\tau)$ . Nous observons une décroissance exponentielle similaire pour les plateaux à  $1G_0$  et à  $2G_0$ , ce qui suggère que le mécanisme de rupture est le même pour la jonction de section diatomique que pour celle monoatomique. En effet, l'étude des probabilités d'apparition des plateaux à  $1G_0$  et à  $2G_0$  (décrite dans l'article à la fin de ce chapitre) montre que l'observation du plateau à  $1G_0$  est indépendante de l'observation ou non du plateau à  $2G_0$ ,<sup>19</sup> ce qui infirme le mécanisme de rupture séquentiel des canaux de conduction.<sup>22</sup>



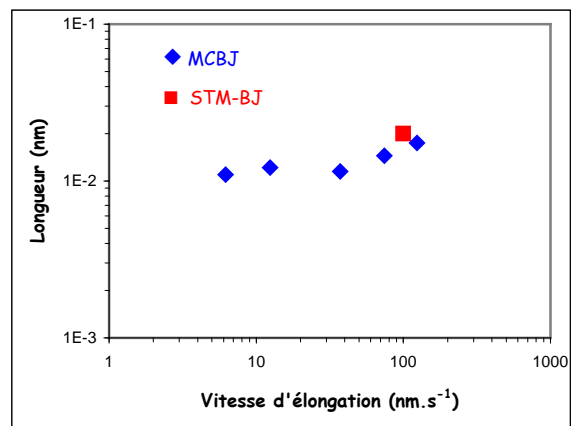
**Figure 4.** Histogrammes normalisés des durées de vie des plateaux à  $1G_0$  et à  $2G_0$  avec la MCBJ: la probabilité suit une loi de décroissance exponentielle et la constante de décroissance exponentielle est équivalente à  $1G_0$  et à  $2G_0$ .<sup>6</sup>

## II.2. Mécanisme de rupture

L'avantage de la MCBJ étant une meilleure stabilité mécanique, nous explorons une gamme de vitesses de séparation des électrodes ou d'élongation ( $6$  à  $124 \text{ nm.s}^{-1}$ ) en variant la vitesse de flexion du support des électrodes, comparé au STM-BJ ( $100 \text{ nm.s}^{-1}$ ). Les plateaux à  $1G_0$  et  $2G_0$  se comportant de façon similaire, la suite de l'étude porte sur les plateaux à  $1G_0$ . La durée de vie et la longueur de plateau, à une vitesse d'élongation de l'ordre de  $100 \text{ nm.s}^{-1}$ , sont comparables entre le STM-BJ et la MCBJ (figures 5). La durée de vie de la jonction décroît avec la vitesse d'élongation (figure 5a), peut-être due à un facteur limitant telle une perturbation aléatoire extérieure fournissant suffisamment d'énergie au système pour casser une liaison et fermer un canal de conduction. Ceci expliquerait également l'histogramme des durées de vie (figure 4). Cependant, les longueurs sont relativement indépendantes des vitesses d'élongation (figure 5b) ce qui infirme l'hypothèse du facteur extérieur. On peut également éliminer l'hypothèse d'une perturbation extérieure indépendante de la vitesse d'élongation.



**5a**



**5b**

**Figures 5.** Durée de vie (5a) et longueur (5b) du plateau à  $1G_0$  en fonction de la vitesse d'élongation : Les longueurs des plateaux sont déduites des durées de vie en connaissant la vitesse de séparation des électrodes ou vitesse d'élongation. Les durées décroissent avec la vitesse d'élongation alors que les longueurs sont relativement indépendantes de la vitesse d'élongation.<sup>6</sup> Les valeurs obtenues avec le STM-BJ<sup>4</sup> à la vitesse d'élongation de  $100 \text{ nm.s}^{-1}$  sont également placées sur ce graphique pour montrer la correspondance avec la MCBJ.

D'après l'évolution de la durée de vie en  $1/v$  (avec une longueur constante),  $v$  étant la vitesse d'élongation de la jonction, on peut imaginer que pour des vitesses nulles, la durée de vie devient « infini ». Ceci pourrait alors donner une jonction particulièrement stable pour l'implanter dans des applications. Cependant les travaux récents de Tsutsui et al.<sup>23</sup> montrent qu'à faible vitesse (inférieur à  $10^{-2}\text{nm.s}^{-1}$ ), la durée de vie ne dépasse pas 10 secondes. Ils l'expliquent par une rupture d'origine essentiellement thermodynamique. Par contre dans nos gammes de vitesses ( $6$  à  $124\text{nm.s}^{-1}$ ), ils attribuent la rupture de la jonction à la contrainte mécanique appliquée. Les auteurs<sup>23-24</sup> établissent même un rapprochement avec le comportement de molécules biologiques complexes modélisés par Evans,<sup>25</sup> alors que les interactions dans les jonctions d'Au sont beaucoup plus simples. En fait, on peut considérer que la jonction à  $1G_0$  casse lorsque la force nécessaire pour extraire un atome d'Au d'une des électrodes dépasse la limite élastique de la jonction.<sup>23</sup> Cette force est de l'ordre de  $1,5\text{nN}$ .<sup>26</sup> La jonction casse alors lorsque les contacts, qui évoluent aussi avec la traction exercée, sont devenus suffisamment rigides.

Par ailleurs, l'indépendance des plateaux à  $1G_0$  et  $2G_0$  suggère que la rupture de la jonction à  $2G_0$  doit être régie par la même physique que la rupture de la jonction monoatomique.<sup>19</sup> On peut alors imaginer que la jonction à  $2G_0$  est formée de deux canaux en parallèle mais de structures asymétriques. C'est en effet une des structures atomiques possibles d'après les calculs de dynamique moléculaire par la méthode des liaisons fortes.<sup>27</sup> Par conséquent, l'un des canaux romprait avant l'autre, avec une durée de vie équivalente à celle d'un seul canal monoatomique, et dû à des forces de même nature. Cependant, ceci conduirait à une corrélation entre les probabilités d'observer un plateau à  $2G_0$  et à  $1G_0$ . Pour expliquer l'indépendance de l'observation de ces plateaux, Thomas Léoni a estimé la quantité d'énergie que peut libérer la rupture d'un canal à  $2G_0$  à  $0,15\text{eV}$ .<sup>26</sup> Cette énergie élastique libérée peut être suffisante pour un réarrangement des atomes dans la jonction. Ainsi, après la rupture de la jonction à  $2G_0$ , le système peut évoluer indifféremment vers une jonction à  $1G_0$  ou vers le régime tunnel.

### III. Conclusion

Dans ce second chapitre, les mécanismes de rupture de la jonction d'Au sont étudiés sur le dispositif de MCBJ. Ces expériences sont en cours avec la thèse de Monzer Alwan (depuis 2009) et nous montrons que les résultats corroborent et étendent ceux obtenus sur le STM-BJ par Thomas Léoni.<sup>4, 19</sup> Un point fort des deux techniques est d'observer la transition entre le contact et le régime tunnel sur des nanojonctions individuelles et de ne réaliser l'étude statistique qu'à posteriori sur les expériences d'élongation répétées. Nous montrons alors que les jonctions à  $1G_0$  et  $2G_0$  subissent le même mécanisme de rupture. De plus, la possibilité de varier les vitesses d'élongation avec la MCBJ permet d'étudier leur influence sur la longueur et la durée de vie de la jonction à  $1G_0$ . Nous en déduisons que la rupture provient de la contrainte mécanique accumulée au niveau de jonction due à la force de traction.<sup>6, 19</sup>

Du point de vue du dispositif, la mise au point de la MCBJ apporte un système mécaniquement stable sur lequel on peut encore diminuer les vitesses d'élongation pour étudier le comportement de la jonction Au-Au aux vitesses très faibles.<sup>23</sup> Par ailleurs, des mesures de conductance d'une molécule (la bipyridine), réalisées par Thomas Léoni sur le STM-BJ (décrites dans l'article à la fin de ce chapitre<sup>28</sup>) montrent qu'après la rupture, les molécules se greffent sur les électrodes en formant une nanojonction Au-molécule-Au dont la conductance est mesurée.<sup>28-30</sup> Par conséquent, la stabilité de la MCBJ permettra également d'étudier le comportement du contact Au-molécule, en variant le groupement d'attache, et de le rapprocher de celui de la jonction Au-Au.

## BIBLIOGRAPHIE du chapitre 2

- <sup>1</sup> Joachim C., Aviron A., Gimzewski J. K., *Nature*, **408**, 541 (2000)
- <sup>2</sup> Mészáros G., Kronholz S., Karthäuser S., Mayer D. and Wandlowski T., Electrochemical fabrication and characterization of nanocontacts and nm-sized gaps, *Appl. Phys. A*, **87**, 569-575 (2007)
- <sup>3</sup> Xu B. Q., Tao N. J., *Science*, **301**, 1221 (2003)
- <sup>4</sup> Léoni T., Contribution à l'étude des contacts atomiques et moléculaires ponctuels, *Thèse* (2009)
- <sup>5</sup> Moreland J., Ekin J. W., *J. Appl. Phys.*, **58**, 3888 (1985)
- <sup>6</sup> Candoni N., Alwan M., Léoni T., Klein H. and Dumas Ph., STM-BJ and MCBJ of gold nanowires: Statistics of ballistic plateaus, en préparation pour *Nanotechnology*, 2010
- <sup>7</sup> Vrouwe S. A. G., Van der Giessen E., Van der Molen S. J., Dulic D., Trouwborst M. L., Van Wees B. J., Mechanics of lithographically defined break junctions, *Phys. Rev. B*, **71**, 035313 (2005)
- <sup>8</sup> Lörtscher E., Weber HB and Riel H *Phys. Rev. Lett*, **98**, 176807 (2007)
- <sup>9</sup> Gonzalez M. T., Wu S., Hubert R., Van der Molen S. J., Schönenberger C., Calame M., *Nano Lett.*, **6**, 2239 (2006)
- <sup>10</sup> Martin C. A., Dapeng D., Van der Zant H. S. J., Van Ruitenbeek J. M., Lithographic mechanical break junctions for single-molecules measurements in vacuum : possibilities and limitations, *New Journal of Physics*, **10**, 065008 (2008)
- <sup>11</sup> Tsutsui M., Teramae Y., Kurokawa S., Sakai A., High-conductance states of single benzenedithiol molecules, *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 163111 (2006)
- <sup>12</sup> Datta S., Electronic transport in mesoscopic systems, *H. Ahmed M. Pepper A. BROERS*, Cambridge University Press (1995)
- <sup>13</sup> Van WEES B. J., Van Houten H. H., Beenakker C. W. J., Williamson J. G., Kouwenhoven L. P., Van der Marel D., Foxon C. T., Quantized conductance of point contacts in a two-dimensional electron gas, *Phys. Rev. Lett.*, **60**, 848 (1988)
- <sup>14</sup> Gimzewski J. K., Moller R., Transition from the tunneling regime to point contact studied using scanning tunneling microscopy, *Phys. Rev. B*, **36**, N°2, 1284-1287 (1987)
- <sup>15</sup> Pascual J. I., Mendez J., Gomez-Herrero J., Baro A. M., Garcia N., Thien Binh V., Quantum contact in gold nanostructures by scanning tunneling microscopy, *Phys. Rev. Lett*, **71**, 1852 (1993)
- <sup>16</sup> Landauer, R., Spatial variation of currents and fields due to localized scatterers in metallic conduction, *IBM Journal of Research and Development*, **1**, 223-231 (1957)
- <sup>17</sup> De La Vega L., Different wavelength oscillations in the conductance of 5d metal atomic chains, *Phys. Rev. B*, **70**, 113107 (2004)
- <sup>18</sup> Scheer E., Agrait N., Cuevas J. C., Levy Yeyati A., Ludoph B., Martin-Rodero A., Rubio G., Bollinger G., van Ruitenbeek J. M., Urbina C., *Nature*, **394**, 154 (1998)
- <sup>19</sup> Léoni T., Zoubkoff R., Homri S., Candoni N., Vidakovic P., Ranguis A., Klein H., Saúl A. and Dumas Ph., Are conductance plateaus independent events in atomic point contact measurements ? A statistical approach, *Nanotechnology*, **19**, 355401 (2008)
- <sup>20</sup> Itakura K. et al., Bias dependence of the conductance of Au nanocontacts, *Phys. Rev. B*, **60**, 11163 (1999)

- <sup>21</sup> Kiguchi M., Konishi T., Murakoshi K., Conductance bistability of gold nanowires at room temperature, *Phys. Rev. B*, **73**, 125406 (2006)
- <sup>22</sup> Dreher M. et al., Structure and conductance histograms of atomic sized Au contacts, *Phys. Rev. B*, **72**, 075435 (2005)
- <sup>23</sup> Tsutsui M., Shoji K., Taniguchi M., Kawai T., Formation and self-breaking mechanism of stable atom-sized junctions, *Nano Letters*, **8**, 345-349 (2008)
- <sup>24</sup> Huang Z. et al., Local ionic and electron heating in single-molecule junctions, *Nat. Nano*, **2**, 698-703 (2007)
- <sup>25</sup> Evans E., *Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **30**, 105 (2001)
- <sup>26</sup> Rubio G., Agraït N., Vieira S, Atomic-Sized Metallic Contacts: Mechanical Properties and Electronic Transport, *Phys. Rev. Lett.*, **76**, 2302 (1996)
- <sup>27</sup> Da Silva E. Z. et al., Theoretical study of the formation, evolution, and breaking of gold nanowires, *Phys. Rev. B*, **69**, 115411 (2004)
- <sup>28</sup> Léoni T., Klein H., Candoni N., Lereu A. L., Dumas Ph., Tools for conductance measurements of metallic and molecular nanowires, *Global Journal of Physical Chemistry*, accepté 2010
- <sup>29</sup> Quek S. Y., Kamenetska M., Steigerwald M. L., Choi H. J., Louie S. G., Hybertsen M. S., Neaton N. B., Venkataraman L., *Nature Nanotechnology*, **10**, 230 (2009).
- <sup>30</sup> Zhou X. S., Chen Z. B., Liu S. H., Jin S., Liu L., Zhang H. M., Xie Z. X., Jiang Y. B., Mao B. W., *J. Phys. Chem. C*, **112**, 3935 (2008)



# Are conductance plateaus independent events in atomic point contact measurements? A statistical approach

Thomas Leoni, Remi Zoubkoff, Sabrina Homri, Nadine Candoni, Petar Vidakovic, Alain Ranguis, Hubert Klein, Andrés Saúl and Philippe Dumas<sup>1</sup>

CINaM-CNRS 3118, Aix-Marseille Université, Faculté de Luminy, Case 913, 13288, Marseille Cedex, France

E-mail: [dumas@cinam.univ-mrs.fr](mailto:dumas@cinam.univ-mrs.fr)

Received 6 May 2008, in final form 18 June 2008

Published 17 July 2008

Online at [stacks.iop.org/Nano/19/355401](http://stacks.iop.org/Nano/19/355401)

## Abstract

Conductance–elongation curves of gold atomic wires are measured using a scanning tunneling microscope break junction technique at room temperature. Landauer's conductance plateaus are individually identified and statistically analyzed. Both the probabilities to observe and the lengths of the two last plateaus (at conductance values close to  $2e^2/h$  and  $4e^2/h$ ) are studied. All results converge to show that the occurrences of these two conductance plateaus on a conductance–elongation curve are statistically independent events.

(Some figures in this article are in colour only in the electronic version)

## 1. Introduction

Nanowires are now considered to be serious candidates for developing future generations of electronic devices. Decreasing the size of objects has revealed new physical phenomena related to electronic, optical, catalytic, thermal and other properties. The understanding of their structure, stability, and electron transport properties is of paramount importance. At the lower size limit such a nanowire can be made of a single molecular chain [1]. Electrical characterization requires one to master the electrodes and to understand their properties at the molecular scale.

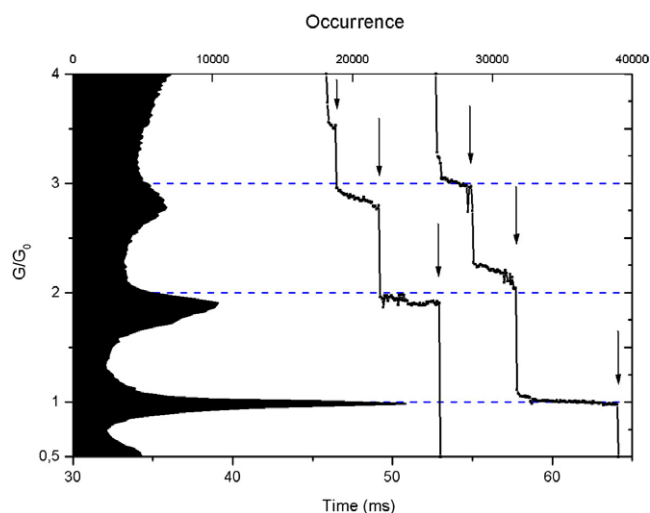
The experimental setup needed to observe Landauer [2] conductance plateaus while breaking noble metal contacts is quite simple. It is at the level of an undergraduate laboratory experiment: two metallic wires (Pt is fine), a 1.5 V battery, a series resistor and an oscilloscope with trace memory are enough to observe the phenomena [3]. The two wires are made to vibrate so they get in and out of contact, and therefore the conductance trace exhibits plateaus. These plateaus correspond to ballistic electron transport through nanometric-sized constrictions. It is nevertheless known that all trials are not successful.

However, to get good statistics, thousands of repeated experiments with data acquisition capabilities are preferred to build a conductance histogram [4, 5]. Figure 1 shows such a histogram based on our own measurements, displayed together with two examples of typical conductance–elongation curves.

This type of histogram, widely used in the field, shows that some preferred values of conductance are observed. In the case of gold, these preferred values were shown [6] to be approximately integer multiples of the Landauer conductance quantum  $G_0 = 2e^2/h$ , where  $h$  is Planck's constant and  $e$  is the electron charge.

The mechanically controlled break junction (MCBJ) or scanning tunneling microscopy operated in the break junction regime (STM-BJ) are first choice experimental methods for such conductance studies of metallic nanoconstrictions. Since the early 1990s, simultaneously with an extensive theoretical work [7], the MCBJ and STM-BJ have been used in air [5], in liquids [8, 9] or in vacuum [4, 10]. Direct visualization of the nanocontact has been achieved in transmission electron microscopy [11, 12]. Conductive-AFM has allowed simultaneous measurement of the stiffness and of the conductance of the wire [13]. Electron–phonon interaction [14] and light emission [15] from such nanocontacts have also been reported. Since the beginning, most of the

<sup>1</sup> Author to whom any correspondence should be addressed.



**Figure 1.** Scaled conductance (vertical axis) cumulated histogram (upper horizontal axis) constructed from 9876 gold break junction curves showing the characteristic peaks close to integer multiples of the Landauer conductance quantum  $G_0 = 2e^2/h$ . The longer a plateau the higher its contribution to the cumulative histogram. Two conductance elongation (bottom horizontal axis; the stretching rate is  $100 \text{ nm s}^{-1}$ ) curves are also shown to illustrate the appearance of the plateaus. Room temperature data acquired with an STM-BJ at 70 mV bias.

work has been devoted to metallic junctions [7]. Recently, a new branch has rapidly grown since the publication of the first STM-BJ measurements of single molecule conductance [16].

Conductance histograms exhibiting the above-mentioned characteristic preferential peaks have been obtained both at cryogenic temperatures and at room temperature [17]. While being a powerful statistical tool, such histogram analysis (figure 1) masks subtleties of the data, discarding and hiding important information. For example, it is impossible to detect from a histogram analysis whether the conductance peak at  $G_0$  is due to  $N$  plateaus of average length  $L$  or due to  $N/2$  plateaus of average length  $2L$ .

## 2. Experiments

In this paper, we report the development of a new algorithm aimed at statistically analyzing quantities such as the occurrence, the average conductance or the length of individual plateaus. To achieve this, STM-BJ data are first analyzed to identify individual conductance plateaus, separated by abrupt changes of the conductance.

Data were obtained with two home-made STMs and one commercial STM. Despite significant technical differences of the instruments (vibration isolation, drift, stretching speeds) no significant difference was observed in the results. The STMs were operated at room temperature in ultra-high vacuum ( $10^{-10}$  mbar range). The commercial instrument (Omicron VT) was customized to meet the specific requirements of the experiment. The high gain in-vacuum  $I/V$  converter was short-circuited and replaced by a current limiting resistor (1 k $\Omega$ ) followed by a low gain  $I/V$  converter ( $2 \times 10^5 \text{ V A}^{-1}$ ).

The samples are freshly cleaved mica sheets covered by a 100 nm layer of gold with a preferential [111] orientation. Gold (99.99% purity) is deposited on heated mica sheets by electron beam evaporation under ultra-high vacuum conditions. More details on the gold deposition conditions and resulting properties of gold films can be found elsewhere [18]. After rapid transfer in air, samples are introduced in the STM chamber. Au (or Au-covered, W or Pt-Ir) metallic tips are used for the repeated nano-indentation process.

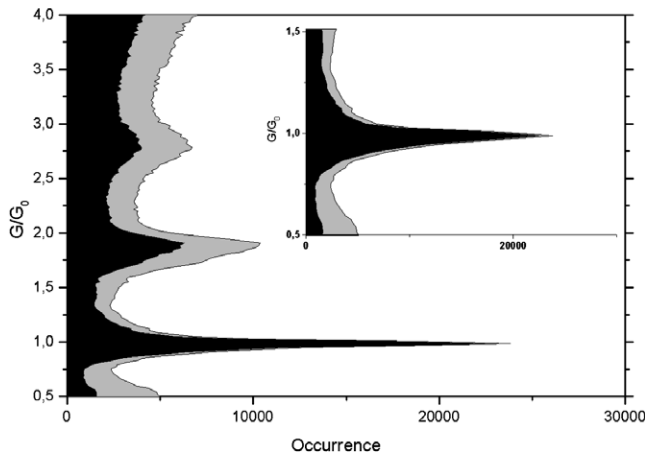
Break junction data are generated and gathered by an independent dedicated software running on a separate computer driving an input/output acquisition card. Briefly, while the STM regulation loop is maintained off, a saw tooth ramp is summed to the (constant) output of the regulation loop to bring the tip into contact prior to breaking of the junction by pulling the tip away. Conductance data are simultaneously acquired at a rate of 14 kHz. Typically, this sequence lasts a few hundreds of milliseconds. Then the regulation loop is active again for  $\sim 1$  s. This cycle is repeated several thousands of times. While data are being acquired, the software displays each conductance–time curve and updates the above-mentioned conductance histogram (see figure 1). More time-consuming processing, required for advanced statistics, is performed after acquisition.

The first task of the data processing is to identify the conductance plateaus. Conventionally, a plateau is defined as the subset of a conductance elongation curve whose conductance lies between two arbitrary values [19, 20]. However, this approach has limits and we prefer to define a plateau as a series of consecutive points (at least three) limited by two *abrupt changes* in the conductance curve.

This criterion is quite natural while it corresponds to what our eyes and brains naturally do to identify a plateau. Indeed when looking at conductance–elongation curves of figure 1 the *abrupt changes* in conductance (marked by downwards arrows) are blindingly obvious. In contrast, it would be difficult to claim that the values of the plateaus' conductance are constant and always close to integer multiple of  $2e^2/h$  [19, 21].

Our criterion has the second advantage of not introducing the arbitrariness of an 'expected' conductance. It is not of prime importance for this study; we do not discuss here the case of molecules of unknown conductance channel transmission [22] but the case of gold atomic junctions, known to have a channel transmission close to one. Our criterion sets two thresholds. Abrupt changes in conductivity are associated with a conductivity change larger than  $0.15G_0$  within one time step. This corresponds to a decay rate faster than the tunneling decay rate as observed when operating with an STM-BJ or with an MCBJ at high stretching speeds [23]. Plateaus shorter than three consecutive acquisition points ( $\sim 200 \mu\text{s}$ ) are discarded. We have checked that our results are not sensitive to variations of these thresholds.

As a result of this preliminary analysis, each conductance–elongation curve could be associated with a discrete set of plateaus. Each of these plateaus could then be characterized in terms of average conductance, length, slope, fluctuations, etc. Finally, the data could be used for the statistical analysis described below.



**Figure 2.** Conductance histograms of the entire set (gray) of data and of the subset (black) of the conductance–elongation curves in which a plateau around  $1G_0$  was identified. The inset is a zoom of the  $1G_0$  peak for which the two histograms are similar. The small discrepancy clearly visible in the tails of the  $1G_0$  peak (but also present at the peak maximum) is mainly due to conductance–elongation curves not exhibiting plateaus between  $1.5G_0$  and  $0.5G_0$ . Such curves do not contribute to the conductance histogram of the subset of data. Note that the histograms significantly differ around  $2G_0$ .

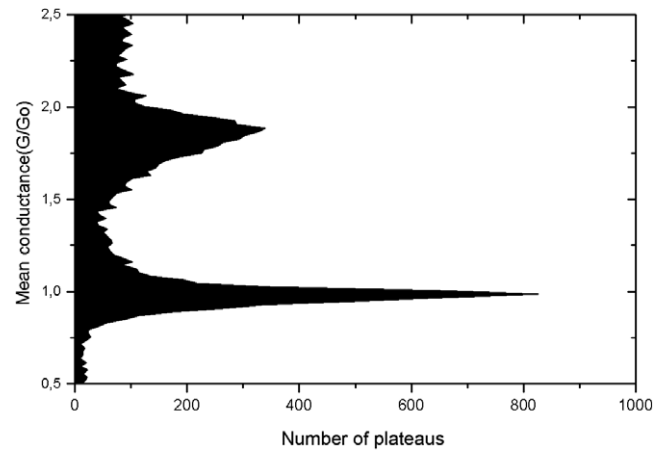
### 3. Results and discussion

We are now armed to analyze the results with respect to occurrence or absence of different plateaus and their eventual correlations.

Figure 2 shows two conductance histograms. In addition to the conductance histogram (in gray) of a set of 9876 conductance–elongation curves, the conductance histogram (in black) of the subset of curves in which a plateau of average conductance occurs between  $0.5$  and  $1.5G_0$  is plotted. As expected, the  $1G_0$  peaks of both histograms are superimposed. This demonstrates that our analyzing software identifies correctly the events we are interested in. It is, however, noteworthy to observe that the amplitudes of the second peak (near  $2G_0$ ) of both histograms differ significantly. This means that a significant number of conductance–elongation curves exhibit a plateau around  $2G_0$  but not around  $G_0$ . The conductance–elongation curves of figure 1 are typical. They were, however, selected to show this effect. We will come back to this point later. While our algorithm conveniently sorts the curves, we can now consider more advanced plateau statistics.

Instead of showing the ‘standard’ conductance histogram, figure 3 shows the histogram of the mean conductance value of the plateaus previously identified. With such a histogram, the length of the plateaus is disregarded. A long or a short plateau with the same average conductance will equally contribute to this histogram. It can be seen that the two types of histogram display similar shapes. This shows that conductance plateaus at  $1G_0$  are not longer than conductance plateaus at  $1.1G_0$ . They are only more frequently observed.

As was stressed above, we now focus on the probabilities to obtain a given plateau within a large set of conductance–elongation curves. Coming back to figure 2, we can now stress that the subset of conductance curves containing a plateau around  $1G_0$  represents 61% of the complete data set containing



**Figure 3.** Mean conductance histogram of the plateaus identified by the algorithm described in the text.

**Table 1.** Comparison of  $P_{1\&2}$  (column 4) and  $P_1 P_2$  (column 5). Different lines correspond to different experimental conditions (bias, STM, speed, . . .) or number of conductance elongation curves ( $N_{\text{curves}}$ , column 1) used for the statistical analysis. Data of line 9 were merged regardless of the experimental conditions during acquisition. All the other figures of this paper were plotted with the data corresponding to the first line of this table.

| Line | $N_{\text{curves}}$ | $P_1$ (%) | $P_2$ (%) | $P_{1\&2}$ (%) | $P_1 P_2$ (%) |
|------|---------------------|-----------|-----------|----------------|---------------|
| 1    | 9876                | 61        | 65        | 40             | 39            |
| 2    | 4938                | 61        | 64        | 41             | 39            |
| 3    | 4938                | 56        | 59        | 35             | 33            |
| 4    | 4938                | 65        | 70        | 46             | 46            |
| 5    | 42775               | 54        | 31        | 17             | 17            |
| 6    | 42721               | 63        | 44        | 28             | 28            |
| 7    | 19356               | 86        | 70        | 61             | 61            |
| 8    | 1250                | 62        | 66        | 43             | 41            |
| 9    | 114728              | 63        | 45        | 31             | 29            |

nearly  $10^4$  curves. Let us note this probability  $P_1$ . Does this mean that we have six chances out of ten to obtain a plateau around  $1G_0$  when we perform a conductance curve? Not quite. Indeed, although we found a similar value (63%) for a dataset (line 9 of table 1) of more than  $10^5$  curves, we have observed fluctuations of this  $P_1$  value computed from different datasets (see table 1). These fluctuations are the result of the correlation between consecutive conductance–elongation curves. If consecutive conductance–elongation curves were uncorrelated or statistically independent,  $P_1$  values computed from different datasets should be very close to each other, provided each dataset is large enough. To probe the correlation between consecutive conductance–elongation curves, the set of 9876 curves (line 1 of table 1) was separated in two halves. From the first 4938 curves (line 3 of table 1) a  $P_1$  value of 56% is computed, while from the second half (line 4 of table 1) a  $P_1$  value of 65% is computed. The net difference between these two values is very large. It corresponds to eight times the standard deviation. In other words, we cannot assign a  $1/\sqrt{N_{\text{curves}}}$  error bar to  $P_1$ . This is why we do not discuss in this article the absolute value of  $P_1$  as some other groups did [12], but the *conditional* probabilities which we consider more reliable.

We now show that *conditional* probabilities which were neglected in the literature contain valuable statistical information. Table 1 shows, for different sets of data, the probability  $P_1$  ( $P_2$ ) to observe a plateau around  $1G_0$  ( $2G_0$ ) together with  $P_{1\&2}$ , the probability to observe both plateaus on the same conductance–elongation curve.

The last column contains the product  $P_1 P_2$ . The similarity between  $P_{1\&2}$  and  $P_1 P_2$  is striking for all the datasets we have investigated.  $P_{1\&2} \sim P_1 P_2$  shows that the observation of plateau 1 and the observation of plateau 2 are independent events. When retracting the tip to break the contact, the probability to observe a plateau near  $1G_0$  is the same, whether we have observed a plateau around  $2G_0$  or not. The breaking mechanism is often described as a sequential breaking of conductance channels by pulling away the contacts until the tunnel regime is reached [24]. In such a case, a correlation between the occurrence of consecutive plateaus is expected. However, this correlation is not observed here.

Another result supports this conclusion. Since, in our analysis, the plateaus are characterized by their average conductance and lengths, the algorithm is adapted to sort the lengths of different plateaus separately. The fact that the lengths of the plateaus are related to the stability of atomic wires may serve, in principle, as an additional insight into complicated processes governing the breaking mechanisms. Taking advantage of the superior mechanical stability of an MCBJ design, a recent publication explores these effects for a wide range of junction stretching speeds [25]. Our experiments, like most STM-BJ experiments, correspond to stretching speeds in the high-speed regime. This is also the regime for which the length of the plateaus is speed independent. The histogram built for the occurrence of different lengths of the plateaus around  $1G_0$  is shown in figure 4(a). An exponential decay curve fits the data. The same procedure can be applied to the plateaus around  $2G_0$ . The length histogram is plotted in figure 4(b), together with the length histogram of the  $1G_0$  plateaus.

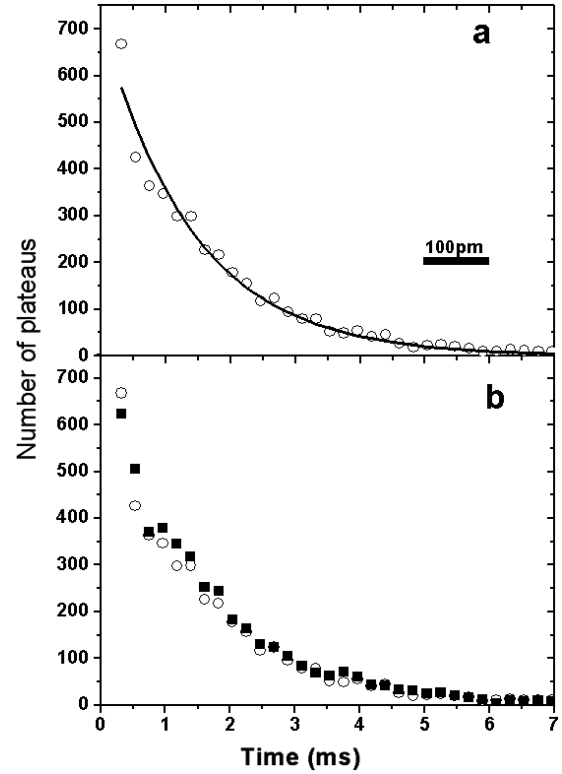
It is clear that both histograms follow almost indistinguishably the same exponential decay function. Other reported room temperature length histograms exhibit a decay dependence of the probability versus the length [19, 20, 25]. We propose a simple mathematical model that accounts for the exponential decay reported here. The main aim of this simple model is to provide quantitative parameters to characterize and compare the length histograms. It does not claim to describe the physics of the breaking.

Let  $p$  be the probability for an atomic wire to break during a time interval  $dt$ . The simplest zero-order approximation that can be made is to assume  $p$  is proportional only to  $dt$ . We thus write

$$p = \frac{dt}{\tau}. \quad (1)$$

Let  $P(t)$  be the probability to measure a single monoatomic wire during a time  $t$  (proportional to its length). If the wire still exists at time  $t + dt$ , this means that the wire was existing at time  $t$  and did not break during  $dt$ . Thus

$$P(t + dt) = P(t)(1 - p). \quad (2)$$



**Figure 4.** (a) Length histogram (circles) of plateau around  $1G_0$ . An exponential decay function (solid line) is also plotted. Its time constant is 1.5 ms. (b) Length histogram (squares) of plateau around  $2G_0$  together with length histogram (circles) of plateau 1. The decay constant is the same. The 100 pm horizontal bar corresponds to a stretching speed of  $100 \text{ nm s}^{-1}$  used. The fact that the two histograms resemble each other is only due to the coincidence that  $P_1 \sim P_2$  on this set of data. In other words the areas below the histograms are the same.

It is straightforward to show that

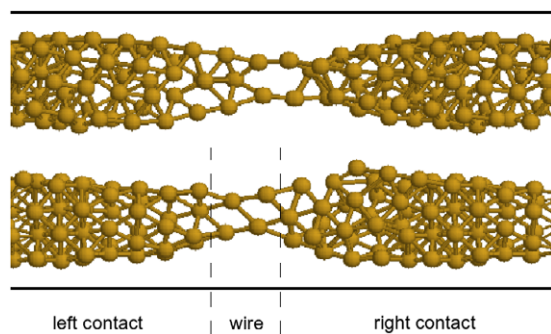
$$P(t) = \exp(-t/\tau)/\tau, \quad (3)$$

which corresponds to the shape of the histograms shown in figure 4.

Although the main aim of this paper is to report quantitative statistical data on the conductance plateaus, a more qualitative discussion of the observed phenomena might be useful as a starting point for further research. We have shown above that the two length histograms exhibit the same decay constant (see figure 4(b)). A trivial reason why the lifetime of the contacts might be the same for the two plateaus could have been that the lifetime is limited by external perturbations, which provide the system with enough energy to break the junction. Moreover, random external perturbations would have resulted in a length histogram exhibiting the reported exponential decay form. However, we have checked that the lifetime of the plateaus is indeed the length of the plateaus. Doubling the elongation rate results in dividing the time constant by a factor of two. The scenario involving an external perturbation can thus be ruled out.

In the range of stretching speeds at which we operated the STM-BJ, it is widely admitted [25] that the  $1G_0$





**Figure 5.** Possible atomic configurations for the  $2G_0$  contact calculated by tight-binding molecular dynamics.

nanowire breaks when the force to drag one atom from one of the contacts exceeds the maximum tensile strength of the monoatomic wire. This maximum tensile strength is ca 1.5 nN [26]. The monoatomic wire breaks when both contacts have evolved to stiff enough structures.

The length histogram thus reflects the different initial atomic configurations of the contacts rather than the actual length of the wire. The atomic configurations of the  $2G_0$  nanowires are largely unknown. Computer simulations can provide a valuable guide. We have performed tight-binding molecular dynamics simulations to study the stretching and the breaking of the nanojunction [28]<sup>2</sup>. Figure 5 shows two possible atomic configurations of the early stages when the conductance is close to  $2G_0$ . The atomic structure of the wires is similar to those published by da Silva and co-workers [29]. The upper part of figure 5 exhibits some similarities with two monoatomic wires in parallel. However, the detail of the atomic arrangement in the left/right contacts and in the wire differs (see figure 5). This would suggest a different breaking mechanism for  $2G_0$  and  $1G_0$  nanowires. Nevertheless, a ca 1.5 nN force change has been experimentally observed when switching from  $2G_0$  to  $1G_0$ : the same value as for breaking the  $1G_0$  nanowire [26].

The breaking of the  $2G_0$  contact thus seems to obey the same physics as the breaking of the monoatomic wire. Indeed, as illustrated in figure 5, the two contacts and the two transmission channels are always asymmetrical. Thus, one of the two conduction channels is expected to break before the other one with the same lifetime as the lifetime of the  $1G_0$  plateau. This could be the explanation for the equality of the two lifetimes.

In such a case, as mentioned above, some correlation between the occurrence of the two plateaus could have been expected. As shown in table 1, this correlation is not observed. It is, however, important to note that the lifetime

<sup>2</sup> The simulations were performed using a tight-binding total energy method [27] with non-orthogonal spd environment-dependent parameters. The parameterization was obtained by fitting simultaneously band structures and total energies of fcc and bcc crystals. It compares satisfactorily well with the first-principles results for low coordinated systems. The initial structure used for the simulations was an 80-atom elongated system with periodic boundary conditions in the longest direction. To simulate the formation of the wire, the period of the cell was incremented by 0.1 Å every 200 molecular dynamics steps. The temperature was maintained fixed using a Berendsen thermostat.

of the plateau at  $1G_0$  might be too short lived to be detected. Following what we explained above for the breaking of the monoatomic nanowire, this is, for instance, likely to occur if the atomic configuration of the two contacts already reaches stiff configurations while stretching the  $2G_0$  nanowire. From an energetic point of view, when the  $2G_0$  nanowire breaks there is a significant elastic energy release. The order of magnitude is 0.15 eV, estimated assuming a tensile force of ca 1.5 nN [26] and a bond elongation of ca 25 pm [26, 28, 29]. This energy release could be enough for a fast, random redistribution of the remaining atoms in the nanojunction. The system could thus evolve either towards the  $1G_0$  contact or directly towards the tunnel regime.

## 4. Conclusion

Conductance–elongation curves of gold nanocontacts were measured with an STM-BJ technique. By detecting the abrupt changes in the conductance, a statistical analysis allows reliable identification of the plateaus. Tens of thousands of curves, acquired at room temperature, with three different STMs, were analyzed. Focusing on the two last plateaus, respectively around  $2G_0$  and  $1G_0$ , we have shown that their occurrences on a conductance curve are statistically independent events. Length histograms also support this conclusion.

Although somewhat surprising when imagining the motion of atoms while breaking the contact, this result seems robust and was observed in all our experiments. This effect might be due to the elastic energy release when breaking the  $2G_0$  plateau. It would be interesting to probe this result with independent data acquired with other apparatus, especially with MCBJs in the low-speed stretching regime where breaking is dominated by the self-breaking mechanism.

## Acknowledgments

We thank Roger Morin for his interest and stimulating discussions, and Khaya Sengupta for carefully reading the manuscript.

## References

- [1] Lu W and Lieber C M 2007 *Nat. Mater.* **6** 841
- [2] Landauer R 1957 *IBM J. Res.* **1** 223
- [3] Costa-Kramer J L, Garcia N, Garcia-Mochales P and Serena P A 1995 *Surf. Sci.* **342** 1144
- [4] Krans J M, Muller C J, Yanson I K, Govaert T C M, Hesper R and van Ruitenbeek J M 1993 *Phys. Rev. B* **48** 14721
- [5] Gai Z, He Y, Yu H B and Yang W S 1996 *Phys. Rev. B* **53** 10425
- [6] Brandbyge M, Schiøtz J, Sørensen M R, Stoltze P, Jacobsen K W, Nørskov J K, Olesen L, Laegsgaard E, Stensgaard I and Besenbacher F 1995 *Phys. Rev. B* **52** 8499
- [7] Agrait N, Yeyati A L and van Ruitenbeek J M 2003 *Phys. Rep.* **377** 81
- [8] Diaz M, Costa-Kramer J L, Escobar A L, Leon N and Correia A 2002 *Nanotechnology* **13** 43
- [9] Huang Z, Chen F, Bennett P A and Tao N J 2007 *J. Am. Chem. Soc.* **129** 13225

- [10] Agraït N, Rodrigo J G and Vieira S 1993 *Phys. Rev. B* **47** 12345
- [11] Ohnishi H, Kondo Y and Takayanagi K 1998 *Nature* **395** 780
- [12] Rodrigues V, Fuhrer T and Ugarte D 2000 *Phys. Rev. Lett.* **85** 4124
- [13] Rubio-Bollinger G, Bahn S R, Agraït N, Jacobsen K W and Vieira S 2001 *Phys. Rev. Lett.* **87** 6101
- [14] Agraït N, Untiedt C, Rubio-Bollinger G and Vieira S 2002 *Chem. Phys.* **281** 231
- [15] Downes A, Dumas P and Welland M E 2002 *Appl. Phys. Lett.* **81** 1252
- [16] Xu B Q and Tao N J 2003 *Science* **301** 1221
- [17] Sirvent C, Rodrigo J G, Agraït N and Vieira S 1996 *Physica B* **218** 238
- [18] Klein H, Blanc W, Pierrisnard R, Fauquet C and Dumas P 2000 *Eur. Phys. J. B* **14** 371
- [19] Kiguchi M, Konishi T and Murakoshi K 2006 *Phys. Rev. B* **73** 125406
- [20] Itakura K, Yuki K, Kurokawa S, Yasuda H and Sakai A 1999 *Phys. Rev. B* **60** 11163
- [21] Smit R H M, Untiedt C, Rubio-Bollinger G, Segers R C and van Ruitenbeek J M 2003 *Phys. Rev. Lett.* **91** 6805
- [22] Jang S Y, Reddy P, Majumdar A and Segalman R A 2006 *Nano Lett.* **6** 2362
- [23] Martin C A, Ding D, van de Zant H S J and van Ruitenbeek J M 2008 *New J. Phys.* **10** 065008
- [24] Dreher M, Pauly F, Heurich J, Cuevas J C, Scheer E and Nielaba P 2005 *Phys. Rev. B* **72** 075435
- [25] Tsutsui M, Shoji K, Taniguchi M and Kawai T 2008 *Nano Lett.* **8** 345
- [26] Rubio G, Agraït N and Vieira S 1996 *Phys. Rev. Lett.* **76** 2302
- [27] Mehl M J and Papaconstantopoulos D A 1996 *Phys. Rev. B* **54** 4519
- [28] Zoubkoff R and Saúl A 2008 in preparation
- [29] da Silva E Z, Novaes F D, da Silva A J R and Fazzio A 2004 *Phys. Rev. B* **69** 115411

## Tools for conductance measurements of metallic and molecular nanowires

Thomas Leoni, Monzer Alwan, Hubert Klein, Nadine Candoni,  
Aude L. Lereu, Philippe Dumas\*

CINaM CNRS, UPR 3118 & Aix-Marseille Université Faculté des Sciences de Luminy,  
13288 Marseille Cedex 9, France

\*Author for correspondence: Philippe Dumas, email: dumas@cinam.univ-mrs.fr  
Received 15 Oct 2010; Accepted 3 Dec 2010; Available Online 30 May 2011

### Abstract

Conductance-elongation curves of gold nanojunctions exhibit characteristic plateaus just prior to breaking. Conductances of these plateaus are integer multiples of the quantum of conductance. These plateaus occur because, in this size regime, transport is ballistic and the conductance is independent of the length of the nanojunction. We developed a STM-based break junction technique to access to the conductance-elongation curves. In this paper, specific tools adapted for measurements in solution are described. We then report on our results obtained for both metallic and molecular nanowires.

**Keywords:** Single molecule conductance; Break junction; Ballistic transport

### 1. Introduction

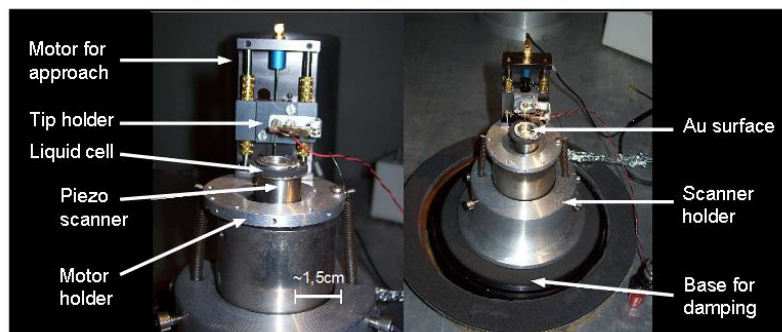
During the last decades, the study of conductance in metallic nanowires has interested many groups employing different techniques to investigate electron transport which is ballistic at the nanometer scale.

One of the first techniques, to access to these conductance measurements in atomic-sized contacts, employs Scanning Tunneling Microscopy in Break Junction regime (referred to as STM-BJ) [1,2]. In STM-BJ, one measures the conductance between a tunnel tip and a metallic surface. In the case of a gold tip and a gold surface, the current between the contact point and the vacuum tunneling, displays a transition stage. This transition occurs in the nanoscale working regime meaning that the junction length becomes smaller than the electron elastic mean free path. Hence, the conductance is expected to become invariant with the junction length. This regime is referred to the ballistic regime. The transition, between contact and tunneling regime, explores the ballistic regime and conductance-elongation curves exhibit characteristic plateaus. These plateaus are multiples of the Landauer quantum of conductance  $G_0 = 2e^2/h$ , where  $h$  is Planck's constant and  $e$  the electron charge [3]. Recently, we have experimentally and numerically studied the configuration of gold nanowires at these plateaus [4, 5]. We have correlated the appearance of the plateaus at  $G_0$  for monoatomic

nanowires and  $2G_0$  for diatomic nanowires linking the tunneling tip to the surface.

STM-BJ is a very robust technique that has been used in a broad range of experimental conditions, ranging from cryogenic temperatures to ambient or from ultra-high vacuum to atmospheric pressure or even in liquids [6]. In reference 6, the authors demonstrate the use of STM-BJ for conductance measurements of molecules. They utilize liquids made of "insulating" solvents containing a small amount of "conducting" molecules. These latter possess specific atoms allowing them to attach to the gold electrodes. In this case, one molecule can bridge the gap of the nanojunction modifying the conductance. The resulting conductance-elongation curves evidence then the presence of this molecule and give the conductance value in a straightforward way [6].

In this paper, we present the investigation of single molecule conductance measurements by STM-BJ. We first describe the appropriate tools developments for molecular measurements. These tools include the experimental setup as well as software developments to extract information from the raw experimental data. Although we do not describe the software itself, the main choices for the algorithms are exposed. Thereafter, we discuss the results obtained with gold nanowires and with bipyridine molecules. A comparison with the recent work reported in [7,8], is then presented. Finally, we conclude on the ability of STM-BJ to gain information in term of contact



**Figure 1.** STM-BJ setup. The tip, mounted on the approach motor, is immersed into the all stainless steel liquid cell down to the gold surface (see Figure 2a). The liquid cell is supported by the xyz-piezo scanner. The whole system is isolated from mechanical vibrations and shielded by a Faraday cage.

geometry and in term of electronic transport through single molecules.

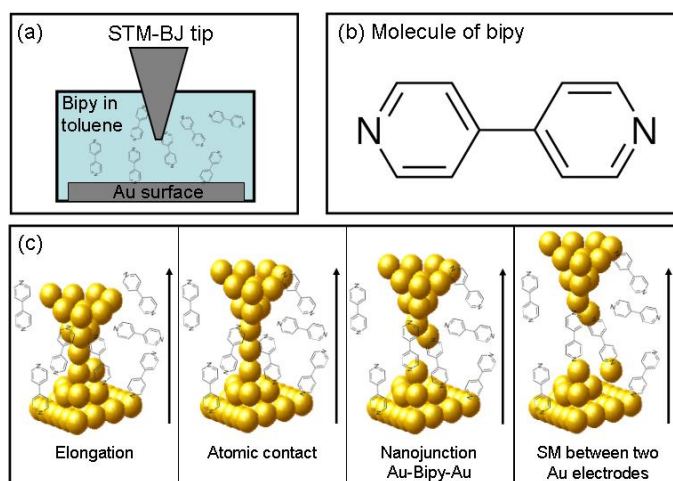
## 2. Experimental

In our experiment, we developed a home-made Scanning Tunneling Microscope (STM) (see Figure 1). The specific hardware is driven by dedicated software so the STM operates as a break junction. Hereafter, the resulting instrument will be referred to as STM-BJ.

This STM-BJ was used to investigate the conductance of gold atomic nanowires and of 4-4' bipyridine (thereafter named bipy and depicted in Figure 2b). To immerse the gold surface and tip into the bipy solution, a stainless steel liquid cell (volume  $\sim 0.3$  mL) is designed and placed on the top of the STM z-piezo as depicted in Figure 1. At the bottom of the liquid cell, the studied surface is positioned. This latter

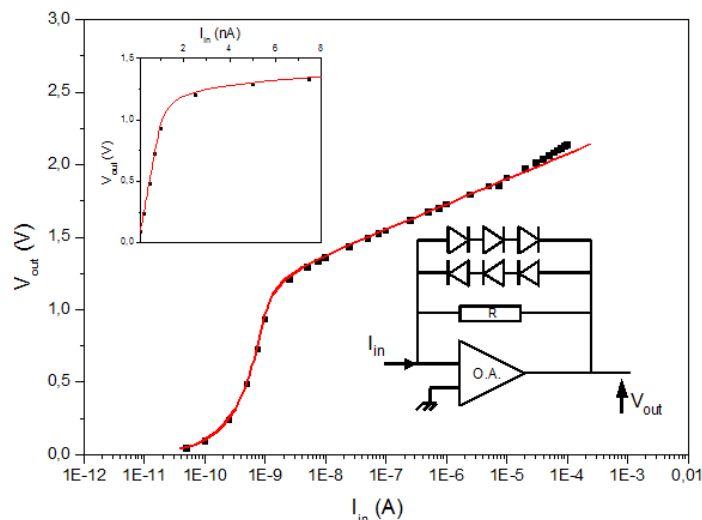
is a 100 nm gold surface evaporated on a freshly cleaved mica substrate. Details of this preparation can be found elsewhere [9]. The liquid cell is then filled with a millimolar solution of 4-4' bipyridine in toluene covering the surface. Thereafter, a gold tip (Goodfellow, purity 99.99+%) is immersed in the solution using a step by step translation stage (MS30, Mechonics) as depicted in Figure 2a). This mechanical part as well as the I/V converter (described below) are placed inside a Faraday cage to minimize external electrical disturbances.

Since we aim in measuring both bipy current (typically hundreds of picoamperes) and gold nanowire current (typically ten microamperes) a high dynamical range of currents is required. We thus developed a quasi-logarithmic I/V converter based on the work reported in reference [10]. The principle is the voltage drop of a diode that is a logarithm function of the current across the diode



**Figure 2.** (a) Scheme of the STM-BJ in solution. In this study the solution is a millimolar solution of 4-4' bipyridine (bipy) in toluene. (b) Representation of a bipy molecule. (c) Schematics of the pulling process in solution from the gold atomic contact until the single molecule (SM) contact.





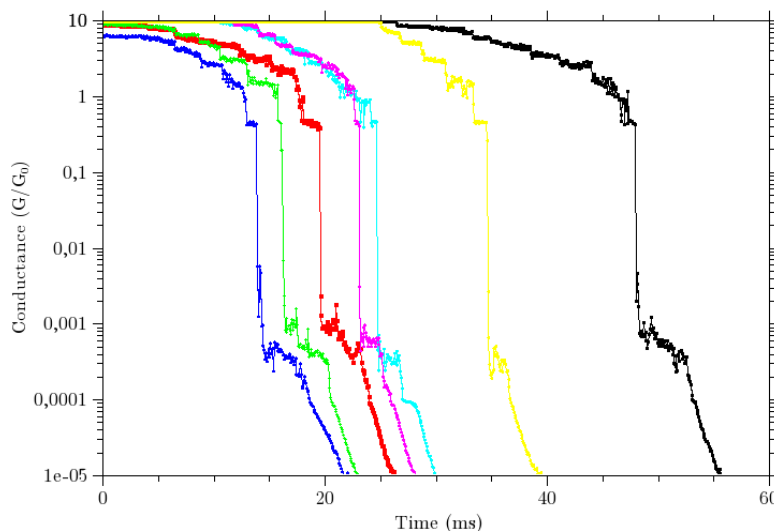
**Figure 3.** Calibration curve of the logarithmic amplifier. The dotted curve corresponds to measurements and the continuous (red) curve corresponds to the analytical fit. The logarithmic behavior above  $2.10^{-9}$  A is due to the diodes whereas the linear behavior in the low current regime (see upper inset) results from the feedback resistor. The lower inset gives a scheme of the I/V converter.

(sensitivity approx. 50mV/current decade/diode). A schematic diagram is shown in the lower inset of Figure 3. Indeed, by cascading several diodes in series, we know that the sensitivity will proportionally increase. Furthermore, mounting two resulting dipoles in parallel, in opposite direction, will allow the current to flow in both directions. In our case, we utilize two dipoles in parallel consisting by three diodes in series. We also add a high impedance resistor in a third branch in parallel to the dipoles in order to improve the sensitivity in the low current regime (see upper inset of Figure 3). This association of diodes and resistor is then used to feedback a low input bias current op-amp (OPA111, Burr Brown) allowing to bias the tip at the virtual ground while the surface is polarized. This device permits to measure at least currents ranging over 7 orders of magnitude (see Figure 3). With the typical values (10-100 mV) used to bias the nanojunction, one measures conductances between  $10^{-5}G_0$  and  $10^2G_0$  (i.e. from tunneling regime to short circuit). This home-made I/V converter is then carefully calibrated under experimental conditions. Finally, the voltage output of the I/V converter is read by an input/output card (National Instrument 6259) that is also used to control the z-piezo (Z sensitivity  $\sim 2$  nm/V) and the approach stepper motor of the STM-BJ. Beside, the acquisition card is piloted by a dedicated program, encoded in Labview, to ensure constant current by feedbacking the z-position. The feedback loop can also be temporally disabled to indent deliberately the surface with the tip. This

is the way we create a nanojunction which will be broken (Break Junction or BJ technique) by pulling the surface away from the tip. Figure 2c explains the formation of the nanojunction until breaking into two electrodes. During the pulling, the current is recorded providing a conductance-elongation curve. The feedback loop is then switched back on. The whole sequence can be carried out a large number of times (up to several hundreds of thousands) to provide statistics [4].

Although noteworthy, is that with our STM-BJ, we use typical z-ramp speeds for the approach-pulling cycle of 100 pm/ms (determined by z-piezo calibration). Therefore a cycle lasts approximately 100 ms. At this time scale, undesired drift can be neglected. However, it is also interesting to study the breaking mechanism at much lower pulling speeds but in this case, much more "rigid" devices such as mechanically controlled break junctions (MCBJ) [11,12], are needed.

Finally, acquisition software tools are implemented in order to display, in real time, two important information. The first one is the conductance curves from the measured current. The second one is the conductance histogram corresponding to the conductance occurrence as a function of the conductance. The conductance histogram shows the preferred conductance values and statistically reveals conductance plateaus. More complex analysis, such as automatic detections of the plateaus, length histograms [4], 2D-histograms, correlations between events and so on, are performed off-line.



**Figure 4.** Typical conductance-elongation curves exhibiting plateaus attributed to gold contacts (high conductance regime) and molecular contacts (low conductance regime).

### 3. Results and Discussion

In this study, we benefit from the conductance measurements to discriminate between gold and molecular nanowires. We choose here bipy (molecule representation Figure 2b) as a model system and because it is a well-known bidentate metal ligand in solution due to the donor pairs of its nitrogen atoms. This characteristic permits the bipy to easily graft onto gold surfaces as evidenced by surface enhanced Raman scattering [13], and STM studies [14].

When pulling until breaking a gold nanojunction immersed in a toluene solution containing bipy molecules, two series of plateaus are observed on the conductance-elongation curves. This is shown in Figure 4. The ballistic transport of electrons (through the nanojunction) explains the existence of these plateaus. Indeed within ballistic transport, the conductance does not depend on the stretching of the nanojunction as long as no changes in waist are induced.

Note that in Figure 4, the horizontal axis is in time units (ms) corresponding to raw data. However, the pulling speed (here 80 pm/ms) in our apparatus is known (through piezo calibration) thus the horizontal axis is directly proportional to the elongation.

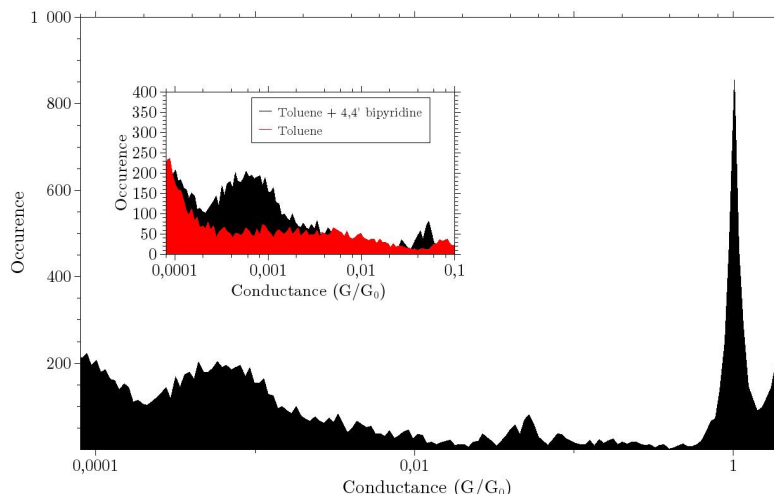
The wide dynamic range of the dedicated I/V converter, described in the experiment section, allows the observation of the ballistic transport through gold nanowires and through bipy within the same conductance-elongation curve. In Figure 4, we plot selected measured conductance-elongation curves

highlighting characteristic plateaus. Two series of characteristic plateaus are observed, one for  $G/G_0 \sim 1$  and one below  $10^{-3}$ .

The plateaus at  $G_0$  and  $NG_0$ , where  $N$  is an integer, are characteristic of the ballistic transport in gold nanowires with monoatomic and  $N$ -atomic waists respectively.

The second set of plateaus at lower values can be attributed to the presence of bipy. Between the gold plateaus and the ones of bipy, we observe a very rapid drop of  $\sim 3$  orders of magnitude in the conductance. This drop coincides with the breaking of the last monoatomic gold nanowire resulting in two nanometer-separated electrodes (Figure 2c). In fact, just prior to breaking, the gold monoatomic nanowire is under tension [15], after breaking the apex of the two electrodes relax and separate faster than the applied pulling speed [16]. At this stage, bipy molecules from the solution or grafted onto the electrodes can bridge the gap resulting in a metal-molecule-metal nanojunction (see right inset of Figure 2c).

We introduced, in the experiment section, the conductance histogram which is a very common statistical tool used in such studies. As we mentioned earlier, the conductance range is spread out from around  $G_0$  for gold to  $10^{-4}G_0$  for bipy. Therefore, in order to clearly display the plateaus for both entities, we plot the conductance histogram in logarithmic scale [17]. Figure 5 shows such a conductance histogram constructed from hundreds of conductance-elongation curves. The peak due to monoatomic gold nanowires is clearly visible at  $G/G_0=1$ . In addition, below  $10^{-3}G_0$ , features are

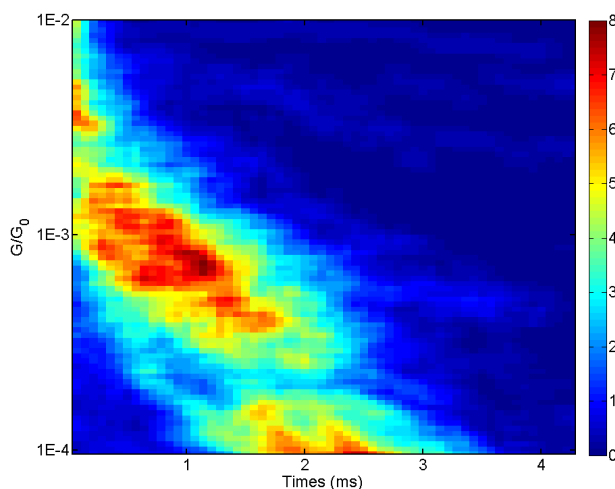


**Figure 5.** Conductance histogram showing the peak at  $G/G_0=1$  and the broader peak due to the contribution of bipy between  $10^{-4}$  and  $10^{-3}$ . The inset displays the additional contribution of bipy (black) with respect to pure toluene (red).

attributed to bipy conductance. The inset of Figure 5 is a zoom in the low-conductance regime together with the pure toluene (the solvent) histogram. The bipy contribution is observed with an average value of  $6 \cdot 10^{-4} G_0$ . This is in very good agreement with recent publications from Xiamen University [7], and Columbia University [8], but quite far from the pioneering work of Arizona State University [6]. A potential explanation of this discrepancy is that we construct histograms using every acquired conductance curves. Furthermore, since we work in a wide dynamic range of conductances, we include almost every possible atomic configurations of the molecule. This also

demonstrates the importance of carrying out statistical studies.

We now intend to go one step beyond in the discussion. When looking into more details in the data plotted in Figure 4, we can see that all the behaviors of the bipy plateaus are similar from one curve to another. We evidence this observation, by superimposing the conductance-elongation curves in a way that the rapid drops after  $G_0$  coincide. Instead of computing the classical conductance-histogram (as in Figure 5) we compute a conductance-elongation histogram as also used in [8]. This 2D histogram is shown in Figure 6. The bipy contribution, between  $2 \cdot 10^{-4} G_0$  to  $2 \cdot 10^{-3} G_0$ , is now displayed more



**Figure 6.** Conductance-elongation histogram proving the effect of the electrodes separation on the bipy conductance. The color scale gives the probability to measure a given molecular conductance for a given metallic electrodes separation.

precisely. By doing so, we prove that the separation distance between the two metallic electrodes influences the conductance through bipy. Figure 6 shows an exponential decay of the conductance with elongation. Possible explanations such as the variation of the angle between the nitrogen-gold bond and the bipy conducting  $\pi$ -system have already been proposed [8]. However, a large number of atomic scenarios can lead to exponential decays. For instance, the progressive decrease (when pulling) of the overlapping between the orbitals of one electrode and the  $\pi$ -system of the molecules can also lead to an exponential behavior. Therefore, one still needs more experimental studies, statistics and comparisons with calculations to be able to sort the potential mechanisms.

Finally, despite lots of improvements, the electrical conductance of single molecules still deserves attention. It has been shown that, even for model molecules such as alkyldithiols, a very large dispersion of the results is observed [18]. This dispersion is first of all due to the large panel of techniques used. Secondly, some techniques extrapolate the single molecule conductance from measurements carried out on a very large number of molecules self-assembled in parallel. In these "averaging" techniques, we cannot rule out important contribution coming from unavoidable defects. Although there is still a long way to fully understand measurements carried out by STM-BJ, this technique has shown its potential in reducing the dispersion for single molecule conductance measurements. We are convinced that STM-BJ will contribute to a better understanding of molecular electronic transport. One of the reasons comes from measurements of single nanojunctions sequentially. *A posteriori*, statistics is then achievable without losing the advantage to look individually at single events and may be to sort them by configurations.

#### 4. Conclusions

In conclusion, we have shown ballistic transport measurements of metallic and molecular nanowires. We have insisted on the importance in analyzing data taking into account every conductance curves. This is a requirement when questing for unknown molecular conductance plateaus. To achieve this goal, we utilized a specific acquisition (and analysis) with the appropriate dynamic range. The asset is the logarithmic current-voltage converter for acquisition together with its analysis' counterpart that is the logarithm histogram. We evidenced the average contribution of bipy molecules at  $6.10^{-4}G_0$  in agreement with recent measurements [7,8]. A deeper analysis using a 2D histogram

gives further insights in the atomic evolution of the pulled nanojunction. We thus proved that the separation distance between electrodes contribute to the control of single molecule conductance. We believe that STM-BJ and MCBJ techniques, based on single nanojunction measurements and thereafter statistics, provide unique opportunities to understand the intimacy of molecule/electrode contacts at the atomic scale. Mastering these contacts is of prior importance for the development of potential single molecule electronics applications.

#### Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Nicolas Battaglini and Sabrina Homri for their interest in the instrumental development.

#### References

1. Agraït, N., Yeyati, A. L., & Ruitenbeek, J. M. V., *entPhys. Rep.* 377 (2003) 81.
2. Agraït N., Rodrigo J. G., & Vieira S., *Phys. Rev. B.* 47 (1993) 12345.
3. Landauer, R., *IBM J. Res. Dev.* 1 (1957) 223.
4. Leoni, T., Zoubkoff, R., Homri, S., Candoni, N., Vidakovic, P., Ranguis, A., Klein, H., et al., *Nanotechnology* 19 (2008) 355401.
5. Klein, H., et al., An atomistic picture of conductance bistabilities in gold point contacts at 100K (To be submitted).
6. Xu, B., & Tao, N. J., *Science* 301 (2003) 1221.
7. Zhou, X., Chen, Z., Liu, S., Jin, S., Liu, L., Zhang, H., Xie, Z., et al., *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 3935.
8. Quek, S. Y., Kamenetska, M., Steigerwald, M. L., Choi, H. J., Louie, S. G., Hybertsen, M. S., Neaton J. B., et al., *Nat. Nanotechnol.* 4 (2009) 230.
9. Klein, H., Blanc, W., Pierrisnard, R., Fauquet, C., & Dumas, P., *Eur. Phys. J. B* 14 (2000) 371.
10. Durig, U.; Novotny, L., Michel, B., Stalder, A., *Rev. Sci. Instrum.* 68 (1997) 3814.
11. Tsutsui, M., Shoji, K., Taniguchi, M., & Kawai, T., *Nano Lett.* 8 (2008) 345.
12. Candoni, N. et al., STM-BJ and MCBJ of gold nanowires: Statistics of the ballistic plateaus (To be submitted).
13. Suzuki, M., Niidome, Y., & Yamada, S., *Thin Solid Films* 496 (2006) 740.
14. Andreassen, G., Vela, M. E., Salvarezza, R. C., & Arvia, A. J., *Langmuir* 13 (1997) 6814.
15. Rubio, G., Agraït, N., & Vieira, S., *Phys. Rev. Lett.* 76 (1996) 2302.

16. Yanson, A. I., Bollinger, G. R., van den Brom, H. E., Agrait, N., & van Ruitenbeek, J. M., *Nature* 395 (1998) 783.
17. González, M. T., Wu, S., Huber, R., van der Molen, S. J., Schönenberger, C., & Calame, M., *Nano Lett.* 6 (2006) 2238.
18. Akkerman, H. B., Kronemeijer, A. J., van Hal, P. A., de Leeuw, D. M., Blom, P. W. M. & de Boer, B., *Small*, 4 (2008) 100. and Akkerman, H. B., *Large-area Molecular Junctions*, PhD thesis University of Groningen, The Netherlands (2008).





# Chapitre 3

## Nucléation d'un cristal unique dans un système microfluidique

Dans ce troisième chapitre, je décris les études de nucléation d'un cristal unique obtenu dans des « nanocristallisoirs »\* grâce à un système microfluidique. Nous nous intéressons à des bio-molécules qui en s'assemblant forment des cristaux, dont nous observons la cinétique de nucléation afin de comprendre et de contrôler les transitions de phase. Pour cela, nous développons un outil et une méthode microfluidique simple d'utilisation et transférable dans un laboratoire de cristallisation. D'une part, l'outil microfluidique permet de former un millier de gouttes reproductibles de volume nanométrique offrant des données statistiques fiables. D'autre part, le stockage de ces gouttes par centaines dans des puces microfluidiques permet d'imposer des chemins thermiques différents. Ainsi, nous déterminons la zone métastable de la molécule modèle étudiée, sa zone de mononucléation et sa fréquence de nucléation. Nous isolons également un polymorphe peu observé dans les conditions classiques de nucléation en « grand » volume. Ce travail est réalisé avec Manuel Ildefonso, étudiant en thèse depuis 2009 et, Palakorn Punnam et Jean-Christophe Renaud, stagiaires d'IUT.

---

\* « Nanocristallisoir » : cristallisoir de volume nanométrique (de l'ordre du nL)

## Introduction

Ce projet vise à comprendre la nucléation des cristaux d'un point de vue fondamental, dans le but d'améliorer leurs qualités spécifiques et leurs propriétés d'usage. Les domaines d'application sont la chimie pharmaceutique (principes actifs), la biologie (protéines), l'optique (minéraux),.... Par exemple, suivant le polymorphe d'un principe actif utilisé en chimie pharmaceutique, la biodisponibilité, la processabilité ou la sécurité du patient se trouveront modifiées. Nous nous intéressons alors tout particulièrement au phénomène de nucléation afin de contrôler les polymorphes et de déterminer la fréquence de nucléation ( $J$ ). En effet, le nombre de cristaux nucléés va conditionner la distribution de taille des cristaux (DTC). En fait, la nucléation est un phénomène qui peut-être lent, difficile ou perturbé par l'apparition d'une autre phase, solide ou liquide, indésirable. De plus, la cristallisation dans les volumes les plus faibles utilisés traditionnellement en cristallisation ( $\geq$  ml) provoque la nucléation de nombreux cristaux. Il est alors difficile de les isoler pour contrôler le polymorphisme ou la fréquence de nucléation. Par ailleurs, des expériences réalisées avec des échantillons de la même solution mère et dans les mêmes conditions donnent des résultats différents dus à la stochasticité du phénomène de nucléation.

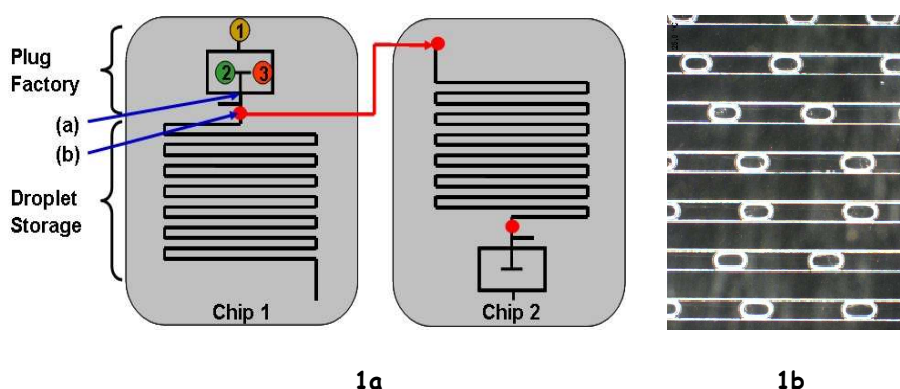
L'idée consiste alors à provoquer la nucléation de manière localisée dans l'espace afin de pouvoir observer la nucléation du cristal unique. La réduction du volume de cristallisation permet d'accéder au contrôle de la nucléation en la dissociant de l'étape de croissance. De plus, nous complétons l'idée en menant un grand nombre d'expériences en parallèle sur ces petits volumes afin d'extraire des données statistiques. Notre but est donc de générer une succession de gouttes indépendantes contenant un ou quelques cristaux et observables dans les mêmes conditions expérimentales. Il existe différentes techniques de miniaturisation telles que les outils microfluidiques,<sup>1-12</sup> les robots de criblage<sup>13-14</sup> et la cristallisation en émulsion.<sup>15</sup> Nous avons choisi l'outil microfluidique, qui a déjà été utilisé dans quelques laboratoires en bénéficiant de développements techniques très sophistiqués : design complexe, systèmes de micropompes et de microvannes, ...<sup>16-17</sup> Cependant notre but est d'utiliser des techniques faciles à mettre en œuvre dans le quotidien d'un laboratoire non spécialiste en microfluidique, afin de tester la transférabilité au laboratoire de cristallisation.

Nous avons donc choisi un système microfluidique simple qui permet de former des gouttes de volume nanométrique (250nL) dispersées dans une phase non miscible.<sup>18</sup> La méthode permet d'immobiliser les gouttes dans le canal microfluidique. Comme chaque goutte est indépendante de ses voisines, la nucléation dans une goutte ne perturbe pas les autres. De plus, le faible volume des gouttes leur confère une grande homogénéité tant en température qu'en terme de concentration et seuls un ou quelques événements de nucléation apparaissent par goutte. Enfin, lors de la croissance d'un cristal après nucléation, seule la goutte contenant le cristal voit sa sursaturation consommée par la croissance. Ainsi ces gouttes deviennent autant de nanocristallisoirs qui peuvent subir les mêmes conditions expérimentales. Grâce à notre système, nous obtenons donc une étude statistique qui présente l'avantage de consommer peu de matière car les molécules d'intérêt (protéines, principes actifs,...) sont souvent disponibles en faible quantité. Pour commencer, nous avons travaillé sur une molécule modèle (lysozyme) sur laquelle notre méthode a permis de déterminer la limite de zone métastable, d'étudier le polymorphisme et de mesurer des fréquences de nucléation.

## I. Statistique de nucléation

### I.1. Mélange du soluté et du solvant

Dans les systèmes microfluidiques, les canaux étant de tailles submillimétriques ( $1\text{-}1000\mu\text{m}$ ), l'hydrodynamique est fortement modifiée. En effet, à ces petites échelles, l'écoulement n'est plus inertiel comme dans les systèmes macroscopiques, car il est contrôlé uniquement par les contraintes de pression et les contraintes visqueuses. Ces phénomènes hydrodynamiques ont été largement étudiés par de nombreux auteurs<sup>1-4</sup> qui montrent que le mélange de solutions monophasiques (solution aqueuse de protéine + solution aqueuse de sel) est en général dominé par la diffusion. Cependant, dans notre cas (figures 1), le mélange est accéléré par la géométrie de la puce qui induit des perturbations à l'interface entre le soluté et le solvant (dus à leurs entrées (2) et (3) en position opposée). La préparation des solutions de notre protéine modèle, le lysozyme, est décrite dans l'article à la fin de ce chapitre.<sup>19</sup>



**Figure 1.** Design des puces microfluidiques que nous utilisons, développées par Salmon et al.<sup>4</sup>: l'huile, les solutions de protéine et de NaCl sont respectivement injectées par les entrées (1), (2) et (3).

**1a)** Méthode de la double puce microfluidique : la « plug factory » génère les gouttes qui peuvent être stockées dans une autre puce, qui est une puce de stockage. En fermant l'entrée et la sortie de la puce de stockage, on « immobilise » jusqu'à 200 gouttes. Plusieurs puces de stockage peuvent ainsi être alimentées avec la même composition chimique.<sup>19</sup>

**1b)** Zoom sur les canaux de  $500\mu\text{m}$  de diamètre et de  $45\text{cm}$  de long contenant des gouttes de  $250\text{nL}$  de volume.

### I.2. Formation des gouttes

Le mécanisme de formation des gouttes est lié à la compétition entre les forces visqueuses qui tendent à des écoulements parallèles le long du canal et les forces capillaires qui tendent à former des gouttes pour minimiser l'énergie de surface.<sup>20</sup> Même s'il n'existe pas de théorie permettant de prévoir le volume et la fréquence de formation des gouttes, des expériences montrent qu'ils dépendent du rapport des débits d'injection, de la géométrie des canaux et du nombre capillaire.<sup>21-22</sup> Dans notre cas, l'introduction d'une huile hydrophobe par la jonction en T (figure 1a (a)) permet de former des gouttes de solution (protéine+sel), sans ajout de tensioactifs qui seraient susceptibles d'induire de la nucléation hétérogène à l'interface eau-huile. La taille des gouttes est alors contrôlée par les débits constants des différents fluides.<sup>10-11</sup> De plus, cette géométrie en T permet des recirculations de liquide à l'intérieur des gouttes ce qui induit un mélange rapide. Ces recirculations sont dues au fait que les gouttes sont contraintes d'avancer en « roulant » dans les canaux pour respecter la condition limite de vitesses nulles aux parois. Les temps de mélange peuvent alors être réduits jusqu'à quelques millisecondes. Par ailleurs, les gouttes présentent un rapport surface sur volume très grand rendant plus rapides les échanges thermiques.

### I.3. Méthode de double puce microfluidique

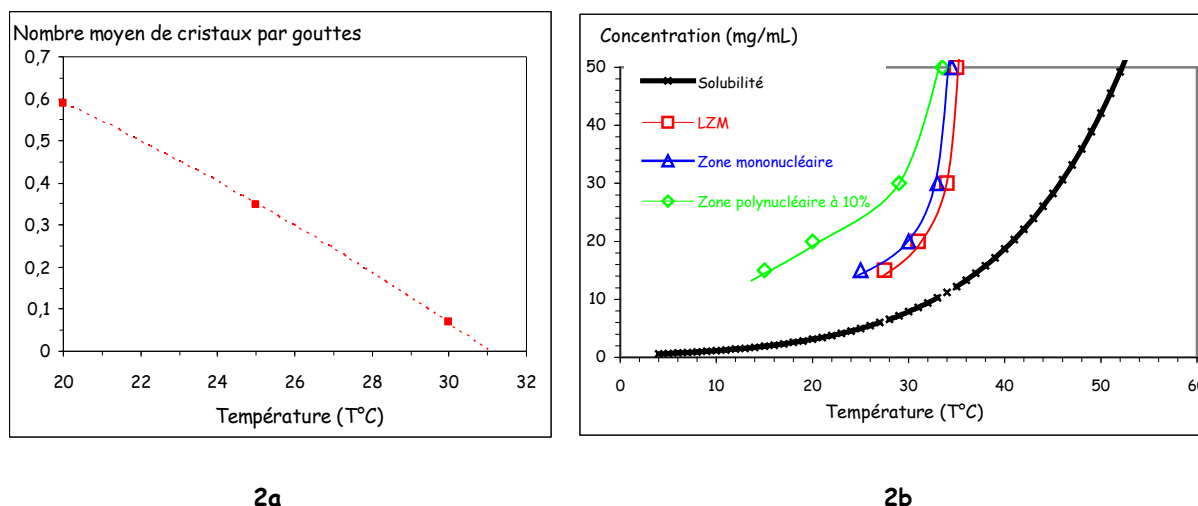
Notre puce microfluidique étant capable de former des gouttes homogènes en taille, composition et température, Manuel Ildefonso a mis au point au début de sa thèse une méthode de double puce microfluidique (figure 1a). Elle est basée sur le remplissage de plusieurs puces de stockage qui sont utilisées en parallèle et dans lesquelles, les gouttes sont immobilisées et subissent différentes conditions de température. Ces puces de stockage sont toutes alimentées par une puce « plug factory » qui y génère des gouttes identiques, ce qui contribue à une étude statistique fiable (figure 1b). Cette méthode est décrite dans l'article à la fin du chapitre ainsi que tout le dispositif expérimental et le principe de comptage des cristaux.<sup>19</sup>

## II. Zone métastable et phase métastable

La zone métastable est la zone de sursaturation dans laquelle la croissance est thermodynamiquement favorisée. Alors qu'au-dessous (en température) de la limite de zone métastable, c'est la nucléation qui est cinétiquement favorisée. Ainsi, la fréquence de nucléation  $J$  ne peut être mesurée qu'au voisinage de la zone métastable.<sup>23</sup> Par conséquent, la détermination de la zone métastable est une étape clef dans l'étude de la nucléation.

### II.1. Détermination de la zone métastable

La zone métastable est caractérisée par la température maximale  $T_{ZM}$  au-dessus de laquelle la solution sursaturée peut rester pendant un temps donné sans perdre sa métastabilité.<sup>24</sup> En déterminant la  $T_{ZM}$  à 4 concentrations différentes, nous obtenons la limite de zone métastable (figure 2) à côté de la courbe de solubilité du lysozyme.<sup>25</sup>



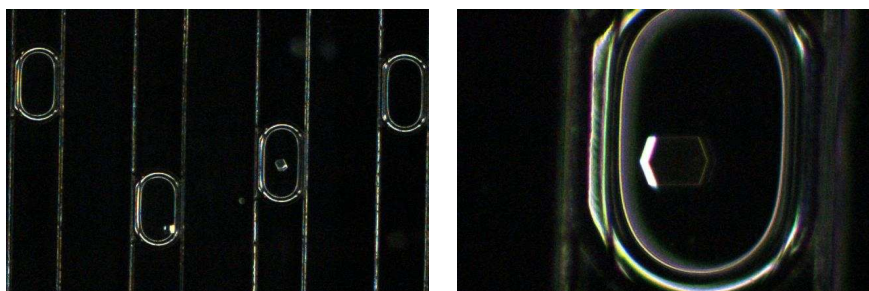
**Figures 2.** Détermination de la zone métastable<sup>19</sup>

**2a)** Nombre moyen de cristaux par goutte en fonction de la température après 20 heures (lysozyme à 20mg/mL, NaCl 0,7M, pH=4,5). A 20mg/mL, la courbe est extrapolée à la température à laquelle il y a 0 cristal. Cette température  $T_{ZM}$  (31°C) est un point de la limite de zone métastable.

**2b)** La  $T_{ZM}$  est déterminée pour chaque concentration étudiée et la zone métastable se situe entre la courbe de solubilité du lysozyme tétragonal<sup>25</sup> et la limite de la zone métastable. La limite de nucléation mononucléaire est déterminée en reportant pour chaque concentration, la température à laquelle, plus d'un cristal est observé. Dans la zone entre cette courbe et la limite de zone métastable, 0 ou un cristal est observé dans les gouttes. Cette zone étant étroite, on peut tracer de la même manière une limite de nucléation polynucléaire à 10%. (Les lignes sont des guides)

## II.2. Nucléation mononucléaire vs polynucléaire

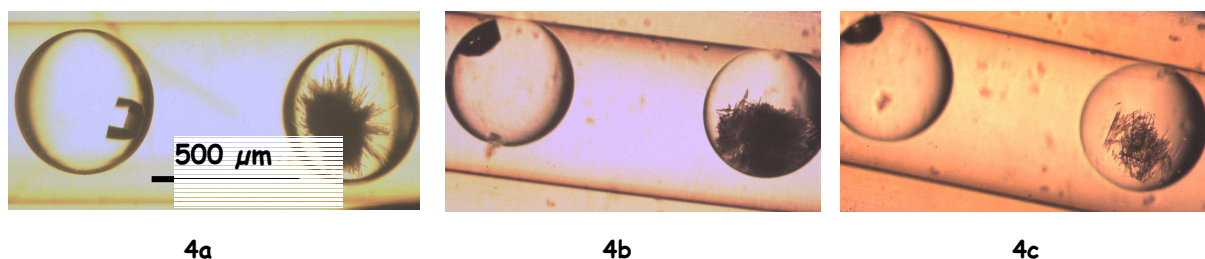
Dans les systèmes de petits volumes comme les méthodes de gouttes<sup>26</sup> ou les méthodes microfluidiques, il est souvent affirmé que la nucléation est mononucléaire. Cependant, ceci est remis en question par des études récentes théoriques<sup>27</sup> et expérimentales<sup>28</sup> effectuées par Romain Grossier, post-doctorant dans l'équipe. C'est aussi le cas de nos expériences à 50mg/mL à 30°C, qui donnent 46% de gouttes présentant plus d'un cristal.<sup>19</sup> On peut alors évaluer une zone de nucléation mononucléaire. Cependant, celle-ci est tellement étroite que nous définissons une zone de nucléation polynucléaire à 10% (figure 2b) qui nous permet d'optimiser le nombre de gouttes contenant au maximum un cristal (figures 3).



**Figures 3.** Observation des gouttes de lysozyme (20mg/mL, 0,7M NaCl, pH=4.5) après 20h à 25°C : les gouttes contiennent 0 ou 1 cristal de lysozyme dans sa phase tétragonale.<sup>19</sup> Echelle: taille du canal 500µm

## II.3. Polymorphisme

En réduisant le volume des gouttes, la probabilité d'observer une phase métastable se trouve augmentée<sup>10, 29</sup> due à la forte sursaturation atteinte.<sup>30</sup> Nos gouttes de volume nanométrique sont alors capable de « geler » la phase métastable,<sup>29</sup> car si le cristal de la phase métastable nucléé seul, il ne peut pas se dissoudre au profit de la phase stable qui est ici absente. Pour cela, la condition est que la phase métastable ait cinétiquement une possibilité de nucléer avant la phase stable, due à sa solubilité plus élevée. Ainsi, à des températures comprises entre 20 et 35°C, seule la phase tétragonale est observée (figures 3) alors qu'il existe d'autres polymorphes pour le Lysozyme.<sup>31-32</sup> Manuel Ildefonso a alors montré que la cinétique était favorable à 6°C, température à laquelle un nouveau polymorphe en faciès d'oursin apparaît au cours des 20h d'incubation des gouttes (figures 4). En effet, la température d'équilibre du lysozyme tétragonal est de 40°C (figure 2b) en considérant que la concentration dans la goutte est diminuée de 5%, soit à 19mg/mL.<sup>19</sup> Alors qu'avec la méthode d'encadrement,<sup>33</sup> la température d'équilibre de la phase en oursin est évaluée à 24°C, ce qui explique sa dissolution à 30°C par rapport à la phase tétragonale.



**Figures 4.** Polymorphisme<sup>19</sup>

**4a)** Observation des gouttes de lysozyme à 20mg/mL (0,7M NaCl, pH=4,5) après 20 heures à 6°C : un nouveau faciès du cristal en oursin apparaît dans quelques gouttes (à droite).

**4b) et 4c)** L'apparition d'un nouveau polymorphe est confirmée en variant la température,<sup>34</sup> ce qui dissout la phase en oursin à 30°C (à droite) alors que le lysozyme tétragonal (à gauche) est stable.

### III. Fréquence de nucléation

Le contrôle de la cinétique de nucléation permet le contrôle du nombre de cristaux produits et aboutit ainsi à un contrôle direct sur la distribution de taille de ces cristaux (DTC). Par exemple dans l'industrie pharmaceutique, des cristaux trop petits seront difficiles à formuler dans la forme finale du médicament alors que des cristaux trop gros n'auront pas les mêmes propriétés de dissolution. De plus dans les deux cas, ils peuvent devenir toxiques. Pour cela, la fréquence de nucléation  $J$  (nombre de germes créés par unité de temps et par unité de volume) est le paramètre qui représente le mieux la cinétique de nucléation.

#### III.1. Nucléation primaire homogène

Dans une première approximation, on peut considérer que nos gouttes ne contenant pas de cristaux de la phase à apparaître et la nucléation ne se produisant pas à l'interface solution-huile, la nucléation peut être décrite par la théorie classique de la nucléation primaire homogène :

- D'un point de vue thermodynamique, les germes se forment dans une goutte exempte de cristaux de la même phase, la nucléation est alors volumique. En considérant que le germe sphérique contient  $n$  molécules, que toutes les faces de ce germe ont la même énergie interfaciale cristal-solution  $\gamma$ , l'équation thermodynamique donne une énergie libre d'activation.<sup>35</sup> Celle-ci étant un maximum, le germe critique de taille  $r^*$  est instable : si on ajoute une molécule ( $r > r^*$ ), le cristal va croître, par contre si on lui enlève une molécule ( $r < r^*$ ), le cristal va se dissoudre, de façon spontanée dans les 2 cas.

- D'un point de vue cinétique, l'apparition du germe cristallin stable ( $r > r^*$ ), reste encore aujourd'hui très difficile à expliquer. La seule théorie classique se fonde sur la nucléation de gouttes de condensation en phase vapeur.<sup>35-37</sup> Par analogie, avant que le germe commence à exister, il s'agit d'abord d'une molécule à laquelle va s'ajouter une autre, puis une autre et ainsi de suite jusqu'à obtenir un germe suffisamment gros pour qu'il devienne un germe critique. Les forces intermoléculaires au sein des germes prévalent alors sur les cristaux, au détriment des énergies de surface. Le germe devient donc stable et on l'appelle nucléus. La fréquence de nucléation, en relation avec ce mécanisme qui dépend de l'énergie d'activation décrite auparavant, est donnée par :

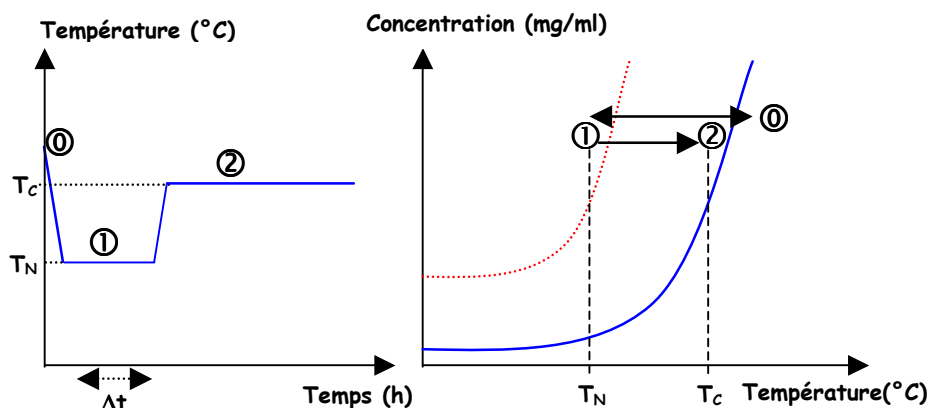
$$J = K_0 \exp\left(-\frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3(kT)^3 \ln^2 \beta}\right) \quad (1)$$

Où  $K_0$  est un coefficient cinétique caractéristique du couple cristal-solution (varie de  $1.10^{11}$  à  $1.10^{31} \text{ m}^{-3}.\text{s}^{-1}$ ),  $\Omega$  est le volume d'une molécule dans le germe ( $\text{m}^3$ ),  $\gamma$  est l'énergie interfaciale cristal-solution ( $\text{J}.\text{m}^{-2}$ ),  $k$  est la constante de Boltzmann ( $1,3805.10^{-23} \text{ J}.\text{K}^{-1}$ ),  $T$  est la température (K),  $\beta$  est la sursaturation (rapport entre la concentration initiale de la solution et la concentration de la solution à saturation après cristallisation).

#### III.2. Méthode de la double pulsion thermique (DPT)

La méthode la plus simple pour mesurer la fréquence de nucléation consiste à mesurer le temps d'induction, qui est expérimentalement le temps mis pour observer les cristaux apparaître. Cependant, le temps d'induction comprenant à la fois le temps de nucléation et celui de croissance pour que les cristaux soient à une taille observable, cette mesure est dépendante de l'outil d'observation. Afin de découpler nucléation et croissance nous avons utilisé la méthode appelée double pulsion thermique (DPT) (figures 5).<sup>38</sup>





5a

5b

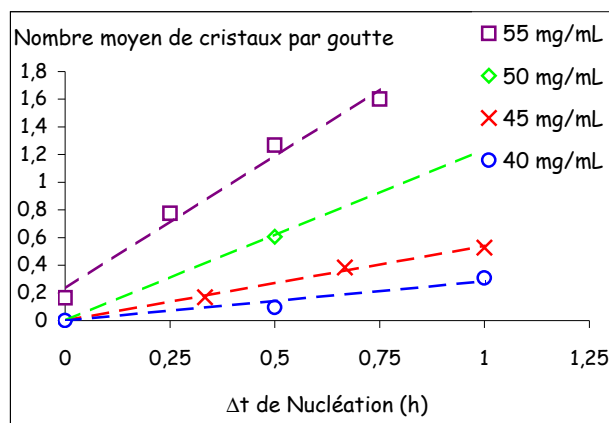
**Figures 5.** Principe de la méthode de la double pulsion thermique (DPT)

**5a)** Température en fonction du temps

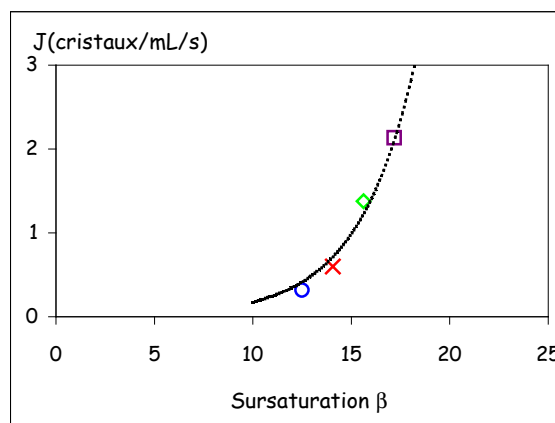
**5b)** Concentration en fonction de la température

Les gouttes sont d'abord portées à ③ (figure 5a) au-dessus de la température de solubilité et toutes les molécules sont solubilisées. Puis, les gouttes sont déplacées à une température de nucléation ① (figure 5a) autour de la limite de la zone métastable pendant un temps déterminé  $\Delta t$  (figure 5b). Pendant  $\Delta t$ , quelques cristaux au maximum nucléent dans les gouttes. Puis, les gouttes sont placées à une température de croissance ② qui se situe au sein de la zone métastable, proche de la courbe de solubilité. Il n'y alors plus de nucléation et seuls les cristaux qui ont nucléé en ① croissent. Enfin, les gouttes sont maintenues à ② jusqu'à ce que les cristaux aient suffisamment cru pour qu'on puisse les observer.

Pour une concentration donnée en lysozyme, le nombre de cristaux est compté pour différents temps de nucléation, ce qui donne une droite dont la pente correspond à la fréquence de nucléation  $J$  (figure 6a). Les fréquences de nucléation obtenues aux différentes concentrations à 20°C donnent une isotherme qui suit une loi exponentielle (figure 6b) en accord avec la théorie classique de la nucléation primaire homogène (1). (Les expériences sont décrites en détail dans l'article à la fin de ce chapitre<sup>39</sup>).



6a



6b

**Figures 6.** Fréquence de nucléation dans la puce microfluidique<sup>39</sup>

**6a)** Nombre de cristaux en fonction du temps de nucléation  $\Delta t$  pour différentes concentrations en lysozyme (0,7M NaCl, pH=4,5) à 20°C. La pente de la droite obtenue pour chaque concentration correspond à sa fréquence de nucléation.

**6b)** Fréquences de nucléation  $J$  (cristaux/mL/s) en fonction de la sursaturation  $\beta$  (rapport entre la concentration initiale de la solution et la concentration de la solution à saturation après cristallisation).

### III.3. Energie interfaciale $\gamma$

L'énergie interfaciale  $\gamma$  traduit l'affinité entre le solvant et le soluté cristallisé. Ainsi, plus l'énergie interfaciale est faible, plus la solubilité du cristal est grande ce qui augmente la probabilité de rencontre des molécules et de formation du germe critique. Dans le cas des deux polymorphes observées à 6°C, ils exposent au solvant soit des atomes différents, soit des atomes identiques disposés différemment. Leurs énergies interfaciales sont donc différentes ainsi que leur fréquence de nucléation. Dans notre étude, les fréquences de nucléation étant déterminées à 20°C, elles correspondent au lysozyme tétragonal et la relation (1) donne un  $\gamma$  de 0,67mJ.m<sup>-2</sup> pour ce polymorphe, valeur qui est dans la gamme de celles de la littérature (0,5-1mJ.m<sup>-2</sup>).<sup>12, 40-41</sup> Concernant le polymorphe en oursin, il fait appel aux mêmes processus de nucléation, croissance et dissolution. Tous les paramètres qui influencent la cinétique de nucléation, tels la sursaturation, la température et le solvant dans notre cas, interviennent également. Ainsi, la fréquence de nucléation peut être déterminée à 6°C pour expliquer le polymorphisme. De même, la tension interfaciale peut être évaluée à 20°C en modifiant le solvant utilisé. Par conséquent, on peut en théorie choisir un solvant dans lequel la tension interfaciale favorisera la nucléation du polymorphe en oursin.

## IV. Conclusion

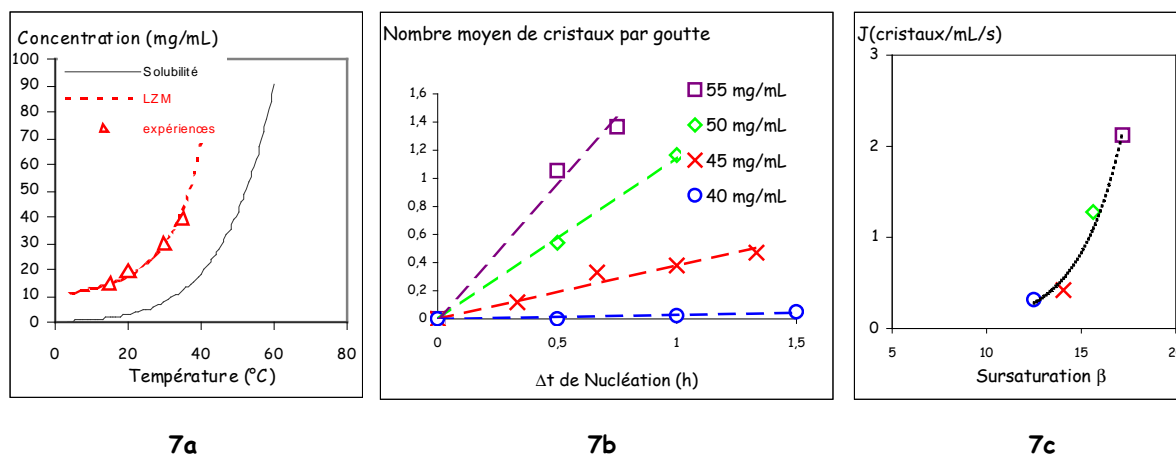
En conclusion, ces premières études de la nucléation en système microfluidique mettent en place un outil simple avec une méthode appropriée facilement transférable au laboratoire de cristallisation. Le but est de travailler sur le diagramme de phase d'une protéine. Notre approche permet alors de déterminer la zone métastable ainsi qu'une zone de nucléation majoritairement mononucléaire. De plus, nous isolons un cristal de la phase métastable. En effet, les fortes sursaturations dans la goutte permettent sa nucléation et le volume nanométrique permet sa stabilisation. Ainsi la phase métastable est ici comme gelée. Par ailleurs, la méthode de la double pulsion thermique appliquée à nos centaines de gouttes identiques aboutie avec précision à la fréquence de nucléation et à l'énergie interfaciale cristal-solution. Enfin, notre méthode microfluidique permet de réduire considérablement la quantité de matière nécessaire.

## Projets de recherche

### I. Microfluidique pour solvants organiques

La puce microfluidique en PDMS utilisée dans cette étude est aujourd'hui la plus facile à réaliser, la plus rapide (un dispositif en une journée) et la plus économique.<sup>42</sup> Cependant, l'utilisation du PDMS est incompatible avec la plupart des solvants organiques.<sup>43</sup> Ces derniers sont souvent employés avec les principes actifs en chimie pharmaceutique. En effet, on peut par exemple modifier l'énergie interfaciale en sélectionnant des solvants de polarité et de proticité différentes ce qui peut favoriser la nucléation d'un polymorphe donné, comme on l'a décrit dans le paragraphe III.3.

Une solution est de retourner aux premières puces en verre ou en silicium mais leur technologie de fabrication est complexe.<sup>43-44</sup> Un nouveau fluoropolymère est alors de plus en plus utilisé, le perfluoropolyether (PFPE), qui est hydrophobe comme le PDMS et chimiquement inerte comme le téflon.<sup>45-46</sup> Manuel Ildefonso a donc montré la faisabilité d'un système de capillaire en PFPE, en générant des gouttes de lysozyme dans les mêmes conditions que dans le travail précédent. Les premières mesures de limite de zone métastable et de fréquences de nucléation (figures 7) sont comparables à celles obtenues précédemment (figures 2b et 6).



**Figures 7.** Zone métastable et fréquences de nucléation dans un capillaire en PFPE

**7a)** La  $T_{ZM}$  est déterminée pour chaque concentration étudiée et la zone métastable se situe entre la courbe de solubilité du lysozyme tétragonal<sup>25</sup> et la limite de la zone métastable ;

**7b)** Nombre de cristaux en fonction du temps de nucléation  $\Delta t$  pour différentes concentrations en lysozyme (0,7M NaCl, pH=4,5) à 20°C. La pente de la droite obtenue pour chaque concentration correspond à sa fréquence de nucléation ;

**7c)** Fréquences de nucléation  $J$ (cristaux/mL/s) en fonction de la sursaturation  $\beta$  (rapport entre la concentration initiale de la solution et la concentration de la solution à saturation après cristallisation).

Le capillaire en PFPE s'avère donc prometteur et nous permettra des développements technologiques sur le dispositif tout en conservant la « simplicité » de son utilisation. Le but est de réaliser un gradient de température dans une même expérience et de mettre en place une observation automatisée pour suivre la nucléation. Nous pourrions ainsi proposer des études de mécanisme de nucléation, de recherche de conditions de cristallisation et de polymorphe, sur des molécules moins « modèles » que le lysozyme pour des applications en chimie pharmaceutique ou en biocristallographie.

## II. Etudes multi-échelle

De nombreux travaux ont été réalisés sur les systèmes microfluidiques dans le domaine de la cristallisation. Cependant, peu d'études ont exploré d'un point de vue fondamental, l'influence de la taille sur la transition de phase qui régit le phénomène de nucléation. Actuellement, nous travaillons sur des gouttes de 250nL dans lesquelles la sursaturation est élevée mais elle varie peu après la nucléation des cristaux. Ces gouttes peuvent donc être assimilées à des systèmes « infinis ». Notre but est d'explorer la gamme de tailles entre le milieu « infini » et le milieu « confiné » afin notamment de découpler les effets thermodynamiques et les effets cinétiques. Les phénomènes observés pourront être comparés aux études de nucléation dans les milieux confinés de Romain Grossier, post-doctorant dans l'équipe, qui provoque la nucléation dans des gouttes de quelques microns de diamètre (femtolitre au picolitre).

D'un point de vue dispositif, nous pouvons aisément réduire la taille des gouttes de 500 $\mu$ m de diamètre à 100 $\mu$ m avec des technologies existantes au laboratoire. De plus, les pertes de charges dans les canaux ou le capillaire seront encore faibles modifiant peu l'écoulement des fluides et permettant la formation des gouttes sans ajout de tensioactif. Par ailleurs, la méthode de détection qui est actuellement simplement optique pourra être couplée à des dispositifs :

- de spectroscopie Raman pour observer des transitions de phases<sup>47</sup>
- de diffusion et diffraction de RX aux petits angles pour analyser la structure de la solution avant et pendant la nucléation.
- de spectroscopie à fluorescence sur des molécules fluorescentes après nucléation.

Enfin, la réduction de la taille permettant de réduire les quantités de matière nécessaires, ces techniques de suivi et de caractérisation de la nucléation seront intéressantes pour les matériaux disponibles en faible quantité ou à forte valeur ajoutée (cristaux de la chimie pharmaceutique, de la biologie, molécules dangereuses explosives ou radioactives,...)

## III. Collaborations

Notre système microfluidique apporte des données de cinétique de nucléation pertinentes pour tout laboratoire qui travaille sur le diagramme de phase d'une molécule. En effet, la nucléation dans des nanocristallisoirs permet d'étudier le cristal unique et de séparer la nucléation de la croissance. Ainsi la délimitation de la zone métastable, l'isolement de phases métastables et la détermination de la fréquence de nucléation sont autant de caractéristiques physico-chimiques qui sont obtenues relativement facilement avec notre méthode. De plus, elle présente également l'avantage d'utiliser peu de matière première. Par conséquent, nous projetons de mettre en place des collaborations sur des matériaux différents de ceux que l'on étudie au laboratoire :

- Collaboration nationale avec Julien Zaccaro de l'Equipe «Matériaux, optique non linéaire et plasmonique» de l'Institut Néel : cette équipe a développé une méthode originale de croissance rapide de cristaux en solution à des températures proches de l'ambiante. Pour cela, ils combinent la circulation de la solution de croissance avec son traitement « en ligne » (surchauffe, ultrafiltration, ultrasons). Le but est d'obtenir des cristaux homogènes de compositions intermédiaires de solutions solides ou des cristaux dopés. Ainsi, ils travaillent actuellement sur la croissance rapide de cristaux de très haute pureté et haute qualité de la famille du KDP ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Les sursaturations nécessaires à leur protocole étant très élevées, l'idée est de les reproduire facilement dans les gouttes de volume nanométrique de notre système microfluidique.

Le but sera alors de montrer l'inhibition de la nucléation suivant leurs traitements « en ligne », utilisés pour atteindre des vitesses de croissance élevées.

- Collaboration internationale avec Juan Manuel Garcia Ruiz du Laboratoire d'Etude de Cristallographie de Grenade (Espagne) : un des projets de cette équipe est l'étude des biomorphes du carbonate de silice dont les structures sont auto-organisées. En effet ces précipités, obtenus sous des conditions géochimiques, présentent des morphologies complètement non-classiques (spirales, cardioides, segmentation, etc.) qui sont interdites par la symétrie cristallographique. Ils s'intéressent alors à la possibilité de créer des structures auto-organisées en laboratoire, qui simuleraient la texture et la forme du squelette (peau, os, dents, ...). Par conséquent, l'étude en système microfluidique leur fournira les données indispensables à la compréhension des mécanismes de nucléation de ces biomorphes. Dans un premier temps, on s'intéressera à la nucléation en milieux confinés de molécules minérales modèles. Pour cela un séjour de 5 mois (début 2011) d'un doctorant espagnol est planifié.

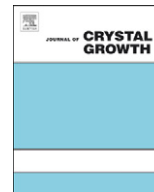
### BIBLIOGRAPHIE du chapitre 3

- <sup>1</sup> Tabeling P., Introduction à la microfluidique, *Belin édition* (2003)
- <sup>2</sup> Stones H. A., Stroock A. D. and Adjari A., *Annu. Rev. Fluid Mech*, **36**, 381 (2004)
- <sup>3</sup> Squires T. M. and Quake S. R., *Rev. Mod. Phys.*, **77**, 977 (2005)
- <sup>4</sup> Laval P., Outils microfluidiques pour l'étude des processus de cristallisation, *Thèse* (2007)
- <sup>5</sup> Hansen C. L., Sommer M. O. A. and Quake S. R., Systematic investigation of protein phase behavior with a microfluidic formulator, *Proc. Natl. acad. sci. USA*, **101**, 14431-14436 (2004)
- <sup>6</sup> Chen D.L., Gerdtz C.J., and Ismagilov R.F., Using Microfluidics to Observe the Effect of Mixing on Nucleation of Protein Crystals, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 9672-9673 (2005)
- <sup>7</sup> Urbanski J. P., Thies W., Rhodes C., Amarasinghe S. and Thorsen T., Digital microfluidics using soft lithography, *Lab on a Chip*, **6**, 96-104 (2006)
- <sup>8</sup> Laval P., Salmon J.-B., and Joanicot M., A microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics, *Journal of Crystal Growth*, **303**, 622-628 (2007)
- <sup>9</sup> Laval P., Lisai N., Salmon J.B., and Joanicot M., A microfluidic device based on droplet storage for screening solubility diagrams, *Lab on a Chip*, **7**, 829-834 (2007)
- <sup>10</sup> Laval P., Giroux C., Leng J., and Salmon J.-B., Microfluidic screening of potassium nitrate polymorphism, *Journal of Crystal Growth*, **310**, 3121-3124 (2008)
- <sup>11</sup> Laval P., Crombez A., and Salmon J.-B., Microfluidic Droplet Method for Nucleation Kinetics Measurements, *Langmuir*, **25**, 1836-1841 (2009)
- <sup>12</sup> Selimovic S., Jia Y., and Fraden S., Measuring the Nucleation Rate of Lysozyme using Microfluidics, *Crystal Growth & Design*, **9**, 4, 1806 (2009)
- <sup>13</sup> Stevens R. C., High-throughput protein crystallization, *Current Opinion in Structural Biology*, **10**, 558-563 (2000)
- <sup>14</sup> Almarsson O.H., Peterson M. L., Morissette S. L., Soukasene S., McNulty C., Tawa M., Macphée J. M., Remenar J. F., High-Throughput Surveys of Crystal Form Diversity of Highly Polymorphic Pharmaceutical Compounds, *Crystal Growth & Design*, **3**, 927-933 (2003)
- <sup>15</sup> Liu J., Nicholson C. E., and Cooper S. J., Direct Measurement of Critical Nucleus Size in Confined Volumes, *Langmuir*, **23**, 7286-7292 (2007)
- <sup>16</sup> Segelke B., Macromolecular crystallization with microfluidic free-interface diffusion, *Expert Review of Proteomics*, **2**, No. 2, 165-172 (2005)
- <sup>17</sup> Thorsen T., Maerkl S. J. and Quake S. R., Microfluidic large-scale integration, *Sciences*, **298**, 580-584 (2002)
- <sup>18</sup> Revalor E., Nucléation en présence de champs externes : Application aux principes actifs pharmaceutiques, *Thèse* (2009)
- <sup>19</sup> Ildefonso M., Revalor E., Punniyam P., Salmon J. B., Candoni N., Veessler S., Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool, *Journal of Crystal Growth*, accepté 2010
- <sup>20</sup> Guillot P., Ecoulement de fluides immiscibles dans un canal submillimétrique : Stabilité et application à la rhéologie, *Thèse* (2006)



- <sup>21</sup> Garstecki P., Fuerstman M. J., Stone H. A. and Whitesides G. M., Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up, *Lab on Chip*, **6**, 437 (2006)
- <sup>22</sup> J. Tice, A.D. Lyon et R.F. Ismagilov. "effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels" *Anal. Chim. Acta*, **507**, 73, (2004)
- <sup>23</sup> Revalor E., Hammadi Z., Astier J. P., Grossier R., Garcia E., Hoff C., Furuta K., Okutsu T., Morin R., and Veesler S., Usual and Unusual Crystallization from Solution, *J. Crystal Growth*, **312**, 939-946 (2010)
- <sup>24</sup> Kashchiev D., Verdoes D., and Van Rosmalen G. M., Induction time and metastability limit in new phase formation, *J. Crystal Growth*, **110**, 373-380 (1991)
- <sup>25</sup> Cacioppo E. and Pusey M. L., The solubility of the tetragonal form of hen egg-white lysozyme from pH 4.0 to 5.4, *J. Crystal Growth*, **114**, 286-292 (1991)
- <sup>26</sup> Kashchiev D., Clausse D., and Jolivet-Dalmazzone C., Crystallization and Critical Supercooling of Disperse Liquids, *Journal of Colloid and Interface Science*, **165**, 148-153 (1994)
- <sup>27</sup> Grossier R. and Veesler S., Reaching one single and stable critical cluster through finite sized systems, *Cryst. Growth Des.*, **9**, 1917-1922 (2009)
- <sup>28</sup> Grossier R., Magnaldo A., and Veesler S., Ultra-fast crystallization due to Confinement. *J. Crystal Growth*, **312**, 487-489 (2010)
- <sup>29</sup> Lee A.Y., Lee I.S., and Myerson A.S., Factors Affecting the Polymorphic Outcome of Glycine Crystals Constrained on Patterned Substrates, *Chemical Engineering & Technology*, **29**, 281-285 (2006)
- <sup>30</sup> Mangin D., Puel F., and Veesler S., Polymorphism in Processes of Crystallization in Solution: A Practical Review, *Organic Process Research & Development*, **13**, 1241-1253 (2009)
- <sup>31</sup> Ataka M., and Asai M., Systematic studies on the crystallization of lysozyme, *J. Crystal Growth*, **90**, 86-93 (1988)
- <sup>32</sup> Legrand L., Ries-Kautt M., and Robert M.-C., Two polymorphs of lysozyme nitrate: temperature dependence of their solubility, *Acta Crystallographica Section D*, **58**, 1564-1567 (2002)
- <sup>33</sup> Astier J. P., and Veesler S., Using temperature to crystallize proteins: a mini-review, *Cryst. Growth Des.*, **8**, 4215-4219 (2008)
- <sup>34</sup> Beckmann W., Boistelle R., and Sato K., Solubility of the A, B and C polymorphs of stearic acid in decane, methanol, butanone, *J. Chem. Eng. Data*, **29**, 211-214 (1984)
- <sup>35</sup> Boistelle R., Concepts de la cristallisation en solution, *Actualités Néphrologiques*, Flammarion Médecine-Science Paris, 159-202 (1985)
- <sup>36</sup> Gibbs J. W., *Collected Works of J.W. Gibbs vol 1 : Thermodynamics*, Vol. I (1948)
- <sup>37</sup> Tsekova D., Dimitrova S., and Nanev C. N., Heterogeneous nucleation (and adhesion) of lysozyme crystals, *Journal of Crystal Growth*, **196**, 2-4, 226-233 (1999)
- <sup>38</sup> Volmer M., *Kinetik der Phasenbildung* (1939)
- <sup>39</sup> Ildefonso M., Candoni N., Veesler S., Using microfluidics for fast accurate measurement of nucleation kinetics, soumis à *Crystal Growth and Design*, octobre 2010
- <sup>40</sup> Galkin O., Vekilov P. G., *J. Phys. Chem. B*, **103**, n°3, 10965 (1999)
- <sup>41</sup> Galkin O., Vekilov P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, n°1, 156 (2000)

- <sup>42</sup> Duffy D. C., McDonald J. C., Schueller O. J., Whitesides G. M., Rapid Prototyping of microfluidic systems in Poly(dimethylsiloxane), *Anal. Chem.*, **70**, 4974 (1998)
- <sup>43</sup> Lee J. N., Park C., Whitesides G. M., *Anal. Chem.*, **75**, 6544-6554 (2003)
- <sup>44</sup> Sherer A., Quake S. R., *Science*, **290**, 1536-1539 (2000)
- <sup>45</sup> Rolland J. P., Michael Van Dam R., Schorzman D. A., Quake S. R., De Simone J. M., Solvent-resistant photocurable "liquid teflon" for microfluidic device fabrication, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2322-2323 (2004)
- <sup>46</sup> Wood C. D., Michel U., Rolland J. P., De Simone J. M., New fluoropolymer materials, *J. Fluorine Chemistry*, **125**, 1671-1676 (2004)
- <sup>47</sup> Starbuck C., Spartalis A., Wai L., Wang J., Fernandez P., Lindemann C. M., Zhou G. X., Ge Z., Process optimization of complex Pharmaceutical Polymorphic system via In Situ Raman Spectroscopy, *Crystal Growth & Design*, **2**, No 6, 515-522 (2002)



# Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool

M. Ildefonso<sup>a</sup>, Eve Revalor<sup>a</sup>, P. Punnam<sup>a</sup>, J.B. Salmon<sup>b</sup>, N. Candoni<sup>a</sup>, Stéphane Veesler<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille, CNRS, Aix-Marseille Université, CINaM-UPR 3118, Campus de Luminy, Case 913, 13288 Marseille Cedex, France

<sup>b</sup> Laboratoire du futur, unité mixte Rhodia/CNRS/Bordeaux-1, 33608 Pessac Cedex, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 26 July 2010

Accepted 12 November 2010

### Keywords:

A1. Nucleation

A2. Growth from solutions

B1. Proteins

## ABSTRACT

We present an easy-to-use microfluidic set-up, easily transferable to the laboratory and determine an accurate method for metastable zone width measurement. We clearly define a zone in the phase diagram where nucleation is mononuclear. We nucleate a single crystal of metastable phase, which turns out to be stable. This approach holds promise for the control and the study of crystallization processes.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Miniaturization of tools to crystallize organic molecules and proteins is a hot topic. Novel methods such as crystallization robots for high-throughput screening [1] and emulsion-based methods have been developed. Examples of the latter include spherical crystallization by the quasi-emulsion method [2,3], methods using the miscibility gap in the phase diagram [4] or microfluidic methods [5]. Working with small volume systems has already proved valuable and holds great promise for the control and the study of crystallization processes, for instance, producing crystals of controlled size [6]. In practice, this makes it possible to increase the number of experiments and decrease the amount of material used [7–9].

In this paper, we focus on nucleation, with an easy-to-use and easily transferable to the laboratory (this technology can be implemented in standard laboratory environments) microfluidic set-up developed by Laval et al. [10,11]. Hundreds of droplets can be formed and stored in a microfluidic chip. These droplets are independent micro-reactors in which the confinement makes it possible to dissociate crystal nucleation from growth, allowing nucleation to be studied and controlled. The high number of droplets in the microfluidic chip yields a large sample of independent crystallization events, a prerequisite for statistical analysis of a stochastic process such as nucleation. Currently, the supersaturation range over which experiments can be performed is rather limited due to the metastable zone. In addition, the nucleation rate  $J$  can only be measured in the vicinity of the metastable zone limit [12]. Thus, determination of the metastable zone width is a key step in nucleation studies. Here, we develop a method to measure

metastable zone width. By using it to examine a protein, the lysozyme, we isolate and observe a metastable polymorph.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Protein solutions

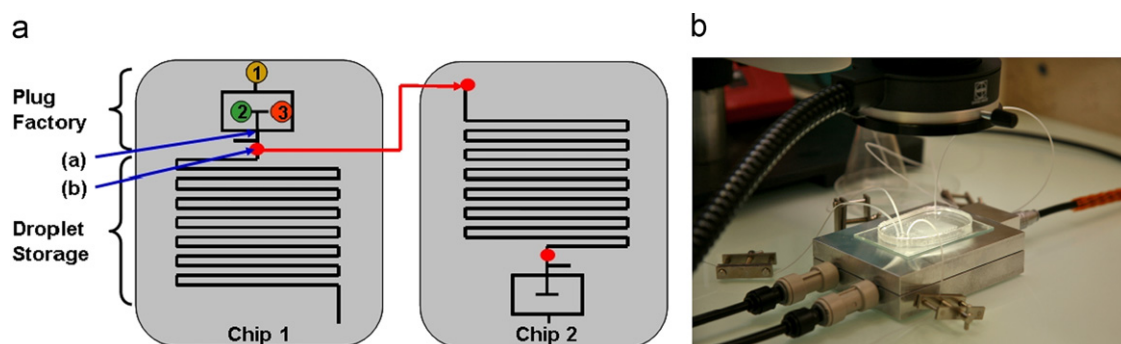
Hen-egg white lysozyme (14600 Da,  $pI=11.2$ ) was purchased from Sigma (batch 057K7013 L2879) and was used without further purification. The purity of lysozyme was checked by molecular sieving. A suitable amount of lysozyme was dissolved in pure water (ELGA UHQ reverse osmosis system) to obtain the stock solutions required. A 1.4 M NaCl solution was also prepared. The different solutions were buffered with 80 mM acetic acid, adjusted to  $pH=4.5$  with NaOH (1 M) and filtered through 0.22  $\mu m$  Millipore filters. The pH was checked with a pHmeter (Schott Instrument, Prolab 1000) equipped with a pH microelectrode. Lysozyme concentrations were controlled by optical density measurements (Biochrom, Libra S22) taking an extinction coefficient of 2.64  $mL\ cm^{-1}\ mg^{-1}$  at 280 nm. In all the crystallization experiments hereunder, the NaCl concentration was fixed at 0.7 M at  $pH=4.5$ .

### 2.2. Droplet generation and storage

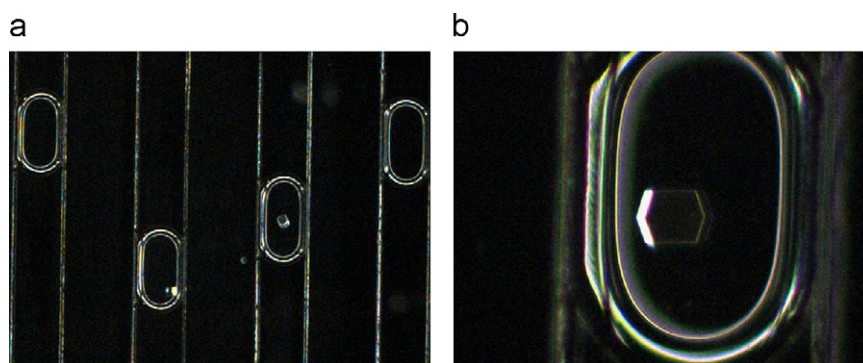
The basic microdevice design and construction was previously described [10]. In our adaptation, shown in Fig. 1, microfluidic chips are divided into 2 parts: the plug factory zone for the generation of droplets and the droplet storage zone.

Plug factory: protein and salt solutions are injected (points 1 and 2 in Fig. 1a) at a rate of 300  $\mu L/h$  with syringe pumps (Biocub BS800) and thus mixed by diffusion. Droplets are generated at the intersection between the silicone oil (Sigma oil AP 100, viscosity 940 cSt) and

\* Corresponding author. Tel.: +336 6292 2866; fax: +334 9141 8916.  
E-mail address: [veesler@cinam.univ-mrs.fr](mailto:veesler@cinam.univ-mrs.fr) (S. Veesler).



**Fig. 1.** (a) Design of the microdevice: oil, protein and NaCl solutions are injected in inlets (1), (2) and (3), respectively, (channel width 500  $\mu\text{m}$ ) and (b) microfluidic experimental set-up with thermostatted sample-holder.



**Fig. 2.** (a) and (b) Droplets of lysozyme solutions (20 mg/mL–0.7 M NaCl–pH=4.5) observed after stored 20 h (channel width 500  $\mu\text{m}$ ).

**Table 1**  
Experimental conditions for metastable zone width determination.

| Protein concentration<br>(mg/mL) | Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) |    |    |    |
|----------------------------------|------------------------------------|----|----|----|
| 15                               | 15                                 | 20 | 25 | 30 |
| 20                               | 20                                 | 25 | 30 | 35 |
| 30                               | 25                                 | 30 | 35 | 40 |
| 50                               | 30                                 | 35 | 40 | 45 |

aqueous streams (point (a) in Fig. 1a), the total flow rate for the oil being 1.4 mL/h. Each droplet has a volume of 250 nL with a volume polydispersity of a few percent [11,13].

Up to 200 droplets are stored, either in the same chip or in another; in this latter case chip 2 is connected to the outlet of the chip 1 plug factory zone (point (b) in Fig. 1a) using micro-tubing (SCI, BB311-24) of 584  $\mu\text{m}$  inner diameter. This procedure allows us to fill several chips with the same chemical composition.

### 2.3. Determining metastable zone

In order to determine the metastable zone width for lysozyme solutions at pH=4.5, we fill 4 microfluidic devices with the same solution and store them at different temperatures for 20 h. Then we observe and count crystals that have nucleated in each drop with a stereomicroscope (Wild Makroskop) equipped with a CCD camera (imaging source, DFK 31BF03). During observation the device is thermostatted by Peltier elements (Anacrismat, France) (Fig. 1b). Typical images at different magnifications are shown in Fig. 2. Different concentrations were tested; experimental conditions are summarized in Table 1.

## 3. Results and discussion

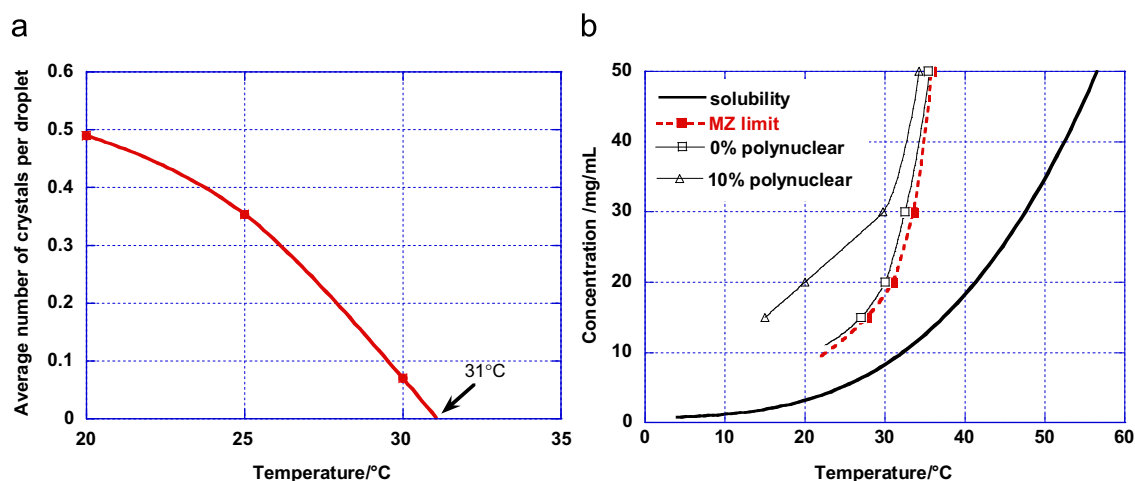
### 3.1. Metastable Zone (MZ) width

The metastable zone limit is characterized by the maximum temperature above which the supersaturated solution can stay for the required time, here 20 h, without losing its metastability [14]. This temperature (at which there is no crystal),  $T_{\text{MZ}}$ , is extrapolated (interpolation) from a plot of the average number of crystals versus temperature (Fig. 3a). Experimental results are summarized in Table 2, i.e. average number of crystals versus temperature for different protein concentrations. Note that we nucleated solely tetragonal lysozyme after 20 h for temperature ranging from 15 to 40  $^{\circ}\text{C}$ .

According to our experimental results the pair protein concentration– $T_{\text{MZ}}$  is a point on the curve that limits the metastable zone. In Fig. 3b, a plot of these pairs for different protein concentrations is presented together with the solubility curve [15]. The metastable zone that we are interested in is situated between the solubility curve and the MZ limit. Note that here we obtained the MZ limit after only 4 experiments because we were able to fill several storage chips using only one generation chip (see part 2.2.). Moreover, the high number of reproducible droplets in the microfluidic chip permits an accurate statistical analysis. To summarize, we show here that this microfluidic method is an accurate and easy-to-use way to determine MZ width.

### 3.2. Mononuclear vs polynuclear nucleation

In the literature, mononuclear nucleation is often claimed for small volume systems, namely droplet methods [16] or microfluidic methods. However, this was recently questioned both



**Fig. 3.** (a) Average number of crystals per droplet versus temperature after 20 h, lysozyme at 20 mg/ml, NaCl 0.7 M and pH=4.5 and (b) tetragonal lysozyme (0.7 M NaCl—pH=4.5) solubility versus temperature according to [15], MZ limit and limit between mono and polynuclear mechanism (see text for explanation), lines improve legibility.

**Table 2**

Results for metastable zone width determination.

| Protein concentration<br>(mg/mL) | <sup>a</sup> | Temperature (°C) |       |       |       |       |       | $T_{MZ}^b$ | $T_{polyN}^c$ |
|----------------------------------|--------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|---------------|
|                                  |              | 15               | 20    | 25    | 30    | 35    | 40    |            |               |
| 15                               | 0            | 57.05            | 64.52 | 90.97 | 99.20 |       |       |            |               |
|                                  | 1            | 31.29            | 27.74 | 4.17  | 0.8   |       |       |            |               |
|                                  | > 1          | 11.66            | 7.74  | 4.86  | 0     |       |       | 27.7       | 25 < T < 27.7 |
|                                  | < n >        | 0.601            | 0.471 | 0.201 | 0.008 |       |       |            |               |
|                                  | N            | 163              | 155   | 144   | 125   |       |       |            |               |
| 20                               | 0            |                  | 64.52 | 76.55 | 94.37 | 100   |       |            |               |
|                                  | 1            |                  | 24.52 | 17.24 | 4.23  | 0     |       |            |               |
|                                  | > 1          |                  | 10.96 | 6.21  | 1.41  | 0     |       | 31.0       | 30.0          |
|                                  | < n >        |                  | 0.490 | 0.354 | 0.070 | 0     |       |            |               |
|                                  | N            |                  | 155   | 145   | 142   | 103   |       |            |               |
| 30                               | 0            |                  |       | 69.62 | 59.84 | 100   | 96.49 |            |               |
|                                  | 1            |                  |       | 27.85 | 31.50 | 0     | 3.51  |            |               |
|                                  | > 1          |                  |       | 2.53  | 8.66  | 0     | 0     | 33.5       | 32.5          |
|                                  | < n >        |                  |       | 0.342 | 0.496 | 0     | 0.035 |            |               |
|                                  | N            |                  |       | 158   | 127   | 122   | 114   |            |               |
| 50                               | 0            |                  |       |       | 18.44 | 79.57 | 100   |            |               |
|                                  | 1            |                  |       |       | 35.46 | 16.13 | 0     |            |               |
|                                  | > 1          |                  |       |       | 46.10 | 4.30  | 0     | 35.8       | 35.6          |
|                                  | < n >        |                  |       |       | 1.794 | 0.258 | 0     |            |               |
|                                  | N            |                  |       |       | 141   | 93    | 101   |            |               |

<sup>a</sup> 0, 1 and > 1 correspond to 0, 1 and more than 1 crystal per droplet in percentage, < n > is the average number of crystals per droplet and N the total number of droplets.

<sup>b</sup>  $T_{MZ}$  extrapolated temperature of metastable zone limit

<sup>c</sup>  $T_{polyN}$  extrapolated temperature for polynuclear nucleation

theoretically [17] and experimentally [18]. Here, we are able to determine a clear zone in the phase diagram where it was observed a single nucleation event, that is to say is mononuclear. From the data presented in Table 2, we can extrapolate a  $T_{polyN}$  from the evolution of number of crystals with temperature, at a fixed protein concentration. For this purpose, an extrapolation similar to the one used for  $T_{MZ}$  is applied to the percentage of droplets where more than one crystal is observed. At  $T_{polyN}$  and above, the probability of observing more than one crystal in a droplet is 0. Data are presented in the last column of Table 2 and plotted in Fig. 3b, leading to a polynuclear limit. The mononuclear zone is situated between the MZ limit and the polynuclear limit. Below this limit, the probability of obtaining more than 1 crystal increases. This mononuclear zone is very narrow (Fig. 3b); to widen it we plotted the 10% limit (Fig. 3b), i.e. where 10% of droplets contain more than 1 crystal. This

strategy yields a greater experimental zone maximizing the number of droplets with 1 crystal.

### 3.3. Polymorphism

By controlling the nucleation mechanism, monodisperse particles can be produced [6]. This is useful in order to isolate a metastable phase. Indeed, it was recently shown that in small volume systems the probability of observing a metastable phase is increased [13,19]. Because of the mononuclear nucleation, the nucleated crystal of the metastable phase being alone cannot dissolve. Thus, small volumes are able to “freeze” the metastable phase [19]. Moreover, the higher supersaturations reached in small volume systems increase the probability of nucleating a metastable phase [20].





**Fig. 4.** Droplets of lysozyme solutions (20 mg/mL (0.7 M NaCl—pH=4.5) observed (a) at 20 °C after stored 20 h at 6 °C, after increasing temperature to 30 °C, (b) after 6 min and (c) after 12 min.

We tested this assertion with lysozyme crystallization for which different polymorphs are known [21,22]. In part 3.1. we showed that with temperatures from 15 to 40 °C we nucleated solely tetragonal lysozyme after 20 h. To nucleate a new phase, we therefore performed experiments at 20 mg/mL and 6 °C for 20 h and we observed (at  $T=20$  °C) a different crystal habit (the sea-urchin habit) in 6 droplets out of 237 (Fig. 4). In a morphodrom of lysozyme crystals, at pH 4.6 and in NaCl solution, Tanaka et al.[23] previously observed the sea-urchin habit but did not assigned it to a new phase. Thus, varying temperature, we verified whether if the 2 crystal habits corresponded to 2 different phases [24] (Fig.4). We increased the temperature to 30 °C and observed the dissolution of the sea urchin-like habit (on the right in Fig. 4b–c) whereas the tetragonal lysozyme (on the left in Fig. 4b–c) was stable and probably continued growing. In addition, we estimate the concentration in the droplet. We assume that droplets are spherical with a diameter of 500  $\mu\text{m}$  and that their initial concentration of lysozyme is of 20 mg/mL. Hence, if a cubic shape lysozyme crystal of 50  $\mu\text{m}$  of edge emerges in a droplet, it decreases its concentration of 5%, that is to say the final concentration is around 19 mg/mL.

In fact, the equilibrium temperature of tetragonal lysozyme, in this experimental condition, is about 40 °C (Fig. 3b). Moreover, using the bracketing method [25] we estimate at  $\pm 1$  °C the equilibrium temperature to be 24 °C for the sea urchin phase in suspension in a 19 mg/mL lysozyme solution. Using this microfluidic method, therefore, we successfully isolate a metastable phase.

#### 4. Conclusion

In this paper, we have shown how an easy-to-use microfluidic set-up, easily transferable to the laboratory (this technology can be implemented in standard laboratory environments), in conjunction with an appropriate method, enables the metastable zone width of a protein to be measured. The technique also enables a zone in the phase diagram where nucleation is mononuclear (one crystal per droplet) to be defined. We also demonstrate the nucleation of a single crystal of a metastable phase, which turns out to be stable; because the metastable phase is “frozen” in the droplet due to the high supersaturations reached in small volume droplets generated by the microfluidic system.

#### Acknowledgements

We thank T. Bactivelane (CINaM) and M. Audiffren (Anacrismat) for their help in the development of the thermostatted sample-holder. ER and SV thank the Sanofi-Aventis group for the financial support and M. Sweetko for the English revision.

#### References

- [1] R.C. Stevens, High-throughput protein crystallization, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (2000) 558–563.
- [2] Y. Kawashima, M. Okumura, H. Takenaka, Spherical crystallization: direct spherical agglomeration of salicylic acid crystals during crystallization, *Science* 216 (1982) 1127–1128.
- [3] F. Espitalier, B. Biscans, C. Laguerie, Particle design Part B: batch quasi-emulsion process and mechanism of grain formation of ketoprofen, *Chem. Eng. J.* 68 (1997) 103–114.
- [4] S. Veessler, E. Revalor, O. Bottini, C. Hoff, Crystallization in the Presence of a Liquid–Liquid Phase Separation, *Org. Process Res. Dev.* 10 (2006) 841–845.
- [5] J. Leng, J.B. Salmon, Microfluidic crystallization, *Lab Chip* 9 (2009) 24–34.
- [6] R.D. Dombrowski, J.D. Litster, N.J. Wagner, Y. He, Crystallization of alpha-lactose monohydrate in a drop-based microfluidic crystallizer, *Chem. Eng. Sci.* 62 (2007) 4802–4810.
- [7] L. Li, D. Mustafi, Q. Fu, V. Tereshko, D.L. Chen, J.D. Tice, R.F. Ismagilov, Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006) 19243–19248.
- [8] J.-U. Shim, G. Cristobal, D.R. Link, T. Thorsen, S. Fraden, Using Microfluidics to Decouple Nucleation and Growth of Protein, *Crystal Growth & Design* 7 (2007) 2192–2194.
- [9] T.M. Squires, S.R. Quake, Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale, *Rev. Mod. Phys.* 77 (2005) 977.
- [10] P. Laval, J.-B. Salmon, M. Joanicot, A microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics, *J. Cryst. Growth* 303 (2007) 622–628.
- [11] P. Laval, A. Crombez, J.-B. Salmon, Microfluidic Droplet Method for Nucleation Kinetics Measurements, *Langmuir* 25 (2009) 1836–1841.
- [12] E. Revalor, Z. Hammadi, J.P. Astier, R. Grossier, E. Garcia, C. Hoff, K. Furuta, T. Okutsu, R. Morin, S. Veessler, Usual and Unusual Crystallization from Solution, *J. Cryst. Growth* 312 (2010) 939–946.
- [13] P. Laval, C. Giroux, J. Leng, J.-B. Salmon, Microfluidic screening of potassium nitrate polymorphism, *J. Cryst. Growth* 310 (2008) 3121–3124.
- [14] D. Kashchiev, D. Verdoes, G.M. Van Rosmalen, Induction time and metastability limit in new phase formation, *J. Cryst. Growth* 110 (1991) 373–380.
- [15] E. Cacioppo, M.L. Pusey, The solubility of the tetragonal form of hen egg-white lysozyme from pH 4.0 to 5.4, *J. Cryst. Growth* 114 (1991) 286–292.
- [16] D. Kashchiev, D. Clause, C. Jolivet-Dalmazzone, Crystallization and Critical Supercooling of Disperse Liquids, *J. Colloid Interface Sci.* 165 (1994) 148–153.
- [17] R. Grossier, S. Veessler, Reaching one single and stable critical cluster through finite sized systems, *Cryst. Growth Des.* 9 (2009) 1917–1922.
- [18] R. Grossier, A. Magnaldo, S. Veessler, Ultra-fast crystallization due to Confinement, *J. Crystal Growth* 312 (2010) 487–489.
- [19] A.Y. Lee, I.S. Lee, A.S. Myerson, Factors Affecting the Polymorphic Outcome of Glycine Crystals Constrained on Patterned Substrates, *Chem. Eng. Technol.* 29 (2006) 281–285.
- [20] D. Mangin, F. Puel, S. Veessler, Polymorphism in Processes of Crystallization in Solution: A Practical Review, *Org. Process Res. Dev.* 13 (2009) 1241–1253.
- [21] M. Ataka, M. Asai, Systematic studies on the crystallization of lysozyme, *J. Cryst. Growth* 90 (1988) 86–93.
- [22] L. Legrand, M. Ries-Kautt, M.-C. Robert, Two polymorphs of lysozyme nitrate: temperature dependence of their solubility, *Acta Crystallogr. Sect. D* 58 (2002) 1564–1567.
- [23] S. Tanaka, M. Yamamoto, K. Ito, R. Hayakawa, Relation between the phase transition and the crystallization in protein solutions, *Phys. Rev.E* 56 (1997) 67–69.
- [24] J.P. Astier, S. Veessler, Using temperature to crystallize proteins: a mini-review, *Cryst. Growth Des.* 8 (2008) 4215–4219.
- [25] W. Beckmann, R. Boistelle, K. Sato, Solubility of the A, B and C polymorphs of stearic acid in decane, methanol, butanone, *J. Chem. Eng. Data* 29 (1984) 211–214.



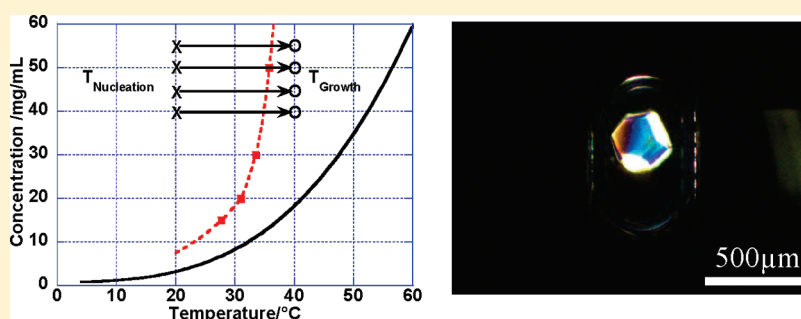
# Using Microfluidics for Fast, Accurate Measurement of Lysozyme Nucleation Kinetics

Published as part of a virtual special issue of selected papers presented at the 9th International Workshop on the Crystal Growth of Organic Materials (CGOM9).

M. Ildefonso, N. Candoni, and S. Veessler\*

Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille CINAM—CNRS, Campus de Luminy, Case 913, F-13288 Marseille Cedex 09, France, In association with Marseille Universities

## ABSTRACT:



Here we measure lysozyme nucleation kinetics using an easy-to-use and simply constructed microfluidics setup previously described. We confirm that microfluidics is a direct, accurate, and fast method to measure nucleation frequency using only a few milligrams of molecules. Moreover, our microfluidics setup, by diminishing crystallizer volumes, increases the experimental supersaturation range accessible and can be applied to all water-soluble molecules.

## 1. INTRODUCTION

In this paper, we focus on nucleation, which plays a fundamental role in crystallization processes, notably determining the physical properties of crystals, including crystal size distribution and phases. The control of nucleation kinetics is a real challenge in many scientific fields, for instance in biology and pharmacology. Although a great deal is known about crystal growth, considerably less is known about crystal nucleation because of the difficulty of obtaining reliable kinetic data. Reliable data are difficult to obtain because nucleation is a stochastic phenomenon and, therefore, an accurate determination of nucleation kinetics requires a large sample of independent nucleation events. With a view to generating kinetic data, microfluidics offers an interesting potential for the control and the study of nucleation, by enabling the number of experiments to be increased and the quantity of molecules to be decreased.<sup>1–4</sup> Here, we employ an easy-to-use and simply constructed microfluidics setup developed by Salmon,<sup>5,6</sup> which we had previously adapted for nucleation research.<sup>7</sup> The hundreds of droplets generated in the microfluidics chip yields a large sample of independent nucleation events. We then investigated the nucleation kinetics of hen-egg white lysozyme (HEWL) using the double pulse technique.<sup>8–10</sup>

## 2. MATERIALS AND METHODS

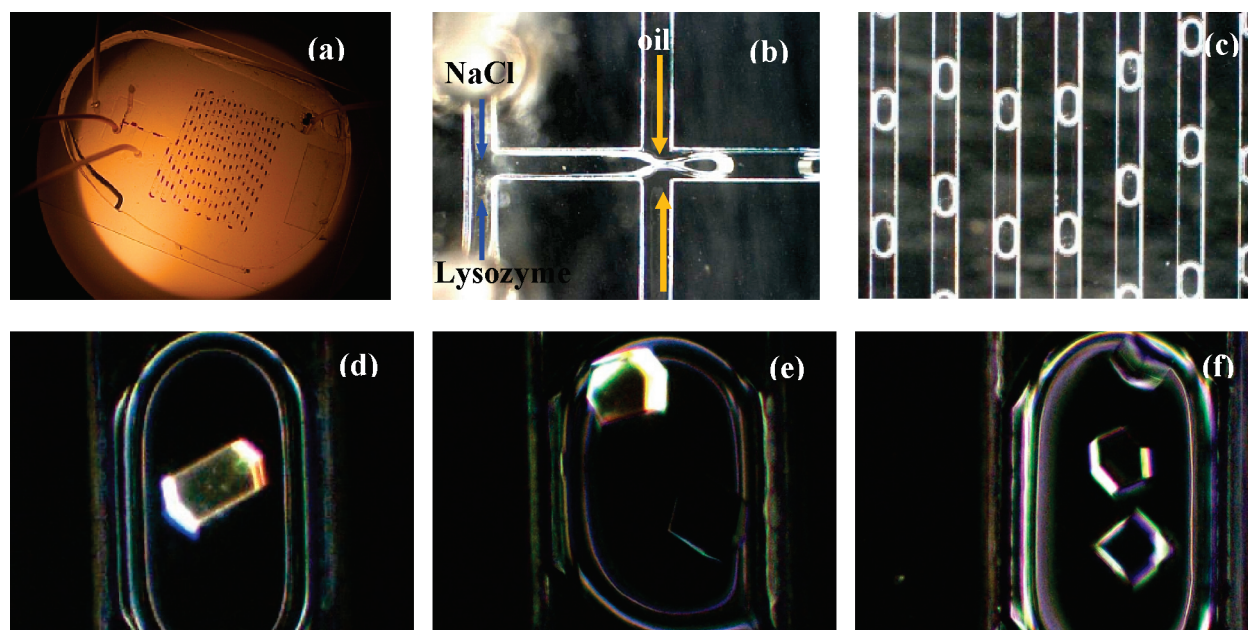
**2.1. Protein Solutions.** HEWL (molecular weight = 14.6 kDa and isoelectric point = 11.2) was purchased from Sigma (batch

057K7013 L 2879) and used without further purification. The purity of lysozyme was checked by molecular sieving. A suitable amount of lysozyme was dissolved in pure water (ELGA UHQ reverse osmosis system) to obtain the stock solutions required. A 1.4 M NaCl solution was also prepared. The different solutions were buffered with 80 mM acetic acid, adjusted to pH = 4.5 with NaOH (1 M) and filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore filters. The pH was checked with a pH meter (Schott Instrument, Prolab 1000) equipped with a pH microelectrode. Lysozyme concentrations were checked by optical density measurements (Biochrom, Libra S22) using an extinction coefficient of 2.64  $\text{mL cm}^{-1} \text{mg}^{-1}$  at 280 nm. In all the crystallization experiments hereunder, the NaCl concentration was fixed at 0.7 M at pH = 4.5.

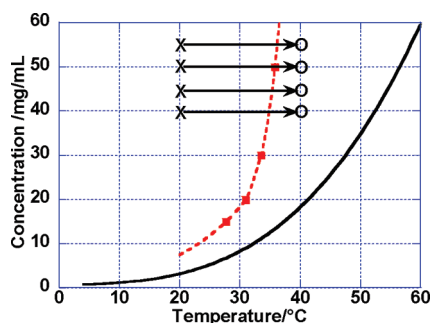
**2.2. Droplet Generation and Storage.** The basic microdevice design is fabricated in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) by using soft-lithographic techniques (Figure 1a); the construction and procedure were previously described.<sup>5,7</sup> Protein and salt solutions were injected into the 500  $\mu\text{m}$ -channel of the chip at a rate of 300  $\mu\text{L/h}$  with syringe pumps (Bioscience BS800) and thus mixed by diffusion. Droplets were generated at the intersection between the silicone oil (Sigma oil AP 100, viscosity 940 cSt) and aqueous streams using the flow focusing method<sup>11,12</sup> (Figure 1b). Up to

Received: October 27, 2010

Revised: March 4, 2011



**Figure 1.** (a) Image of the device, (b) zoom of the inlets of the plug factory showing droplet formation, (c) image of the stored droplets, and (d–f) examples of lysozyme droplets observed after 20 h, at  $T_{\text{nucleation}} = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $T_{\text{growth}} = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (channel width  $500\text{ }\mu\text{m}$ ).



**Figure 2.** Tetragonal lysozyme (0.7 M NaCl, pH = 4.5) solubility versus temperature according to Cacioppo et al.<sup>17</sup> and metastable zone curves according to Ildefonso et al.;<sup>7</sup> lines improve legibility. Points (x) and (o) indicate nucleation and growth conditions, respectively. Arrows represent the experimental path in the phase diagram.

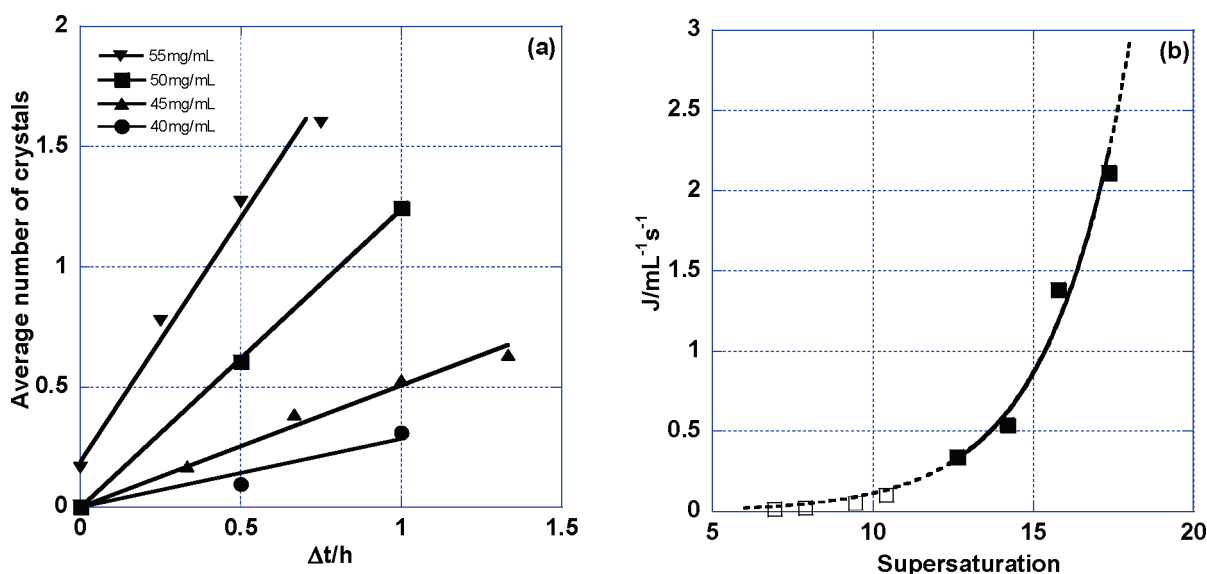
200 droplets were stored in one chip (Figure 1c); each droplet had a volume of 250 nL with a volume polydispersity of a few percent.<sup>6,13</sup> Using the plug factory zone (Figure 1b) for the generation of droplets,<sup>7</sup> several chips could be filled with the same chemical composition. Then the crystals that had nucleated in each drop were observed and counted under a stereomicroscope (Wild Makroskop) equipped with a CCD camera (imaging source, DFK 31BF03). During observation, the device was thermostatted by Peltier elements (Anacrismat, France). Typical images are shown in Figure 1d–f.

**2.3. Determination of Nucleation Rate.** We used the double pulse technique,<sup>8–10</sup> allowing direct determination of the steady-state rate of primary nucleation. At the beginning of an experiment, the solution was loaded into the chip at a temperature chosen to prevent nucleation of crystals,  $T_{\text{growth}}$ . In order to obtain nucleation, we lowered the temperature to a selected  $T_{\text{nucleation}}$ . After a period of  $\Delta t$  (nucleation time), temperature was raised from  $T_{\text{nucleation}}$  to  $T_{\text{growth}}$  (Figure 2). At  $T_{\text{growth}}$  supersaturation was at a level where the nucleation rate was practically zero, but the crystals already formed

could grow to detectable dimensions. The use of this method allows decoupling of nucleation and the ensuing growth. After the growth stage, the crystals nucleated at  $T_{\text{nucleation}}$  during  $\Delta t$  are counted. After plotting the average number of crystals nucleated as a function of the  $\Delta t$ , the steady state nucleation rate is determined as represented by the slope of the straight line plotted. We fitted the experimental crystal distribution with a Poisson law, as previously reported by Galkin and Vekilov.<sup>9</sup> For all experimental conditions, here four chips were filled with the same solution, using the procedure described in section 2.1, allowing four nucleation times to be tested simultaneously. Chips were stored at  $T_{\text{nucleation}}$  in an incubator; because temperature could be reached within 1 min, we used the shortest  $\Delta t$  of 15 min to avoid uncertainties due to  $T$  changes.<sup>9</sup> Moreover, evaporation of water through the PDMS layer is negligible in our experiments because it was previously shown that aqueous droplets stored at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the same device decrease by 10% in about 4 h.<sup>14</sup> It must be noted that for long storage time at  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  if a second nucleation wave occurred, we would observe crystals of different sizes in the same droplet, and this is not the case here; see Figure 1e and f, for instance.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

**3.1. Experimental Parameters.** With the double pulse technique, there are four parameters to adjust:  $T_{\text{nucleation}}$ ,  $T_{\text{growth}}$ , concentration, and nucleation time. We chose a nucleation temperature of  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , in order to compare our data with the data from the literature.<sup>9,15</sup> Since the  $T_{\text{growth}}$  needs to be in the metastable zone, we chose  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figure 2), having previously measured the metastable zone width for lysozyme under the same conditions with the same microfluidics setup.<sup>7</sup> Preliminary measurements showed that the average number of crystals per droplet after 20 h at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  is very low at 20 and 30 mg/mL. Therefore, we conducted experiments between 40 and 55 mg/mL. To test metastability, we also performed experiments at  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , i.e.  $\Delta t = 0$ , for all experimental conditions. The constraint in choice of the nucleation time is the number of crystals



**Figure 3.** (a) Average number of lysozyme crystals nucleated in one droplet versus nucleation time (NaCl = 0.7 M and pH = 4.5), (b) primary nucleation rate vs supersaturation, at 20 °C, (■) from the slope of the straight lines of Figure 2a and (□) data, at 12.6 °C,  $C_s = 1.6$  mg/mL, from Galkin and Vekilov.<sup>18</sup>

**Table 1.** Average Number of Lysozyme Crystals Nucleated in One Droplet<sup>a</sup>

| protein conc (mg/mL) | avg no. lysozyme crystals at the following nucleation times |             |             |             |             |             |             |
|----------------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                      | 0 min   | 15 min      | 20 min      | 30 min      | 40 min      | 45 min      | 1 h         |
| 40                   | 0   |             |             | 0.094 (3.1) |             |             | 0.308 (1.7) |
| 45                   | 0   |             | 0.170 (2.3) |             | 0.385 (1.5) |             | 0.528 (1.9) |
| 50                   | 0   |             |             | 0.606 (1.4) |             | 1.245 (1.8) |             |
| 55                   | 0.164 (4.0)   | 0.776 (2.0) |             | 1.269 (1.7) |             | 1.600 (1.3) |             |

<sup>a</sup>The deviation in % is given in parentheses.

nucleated per droplet. Due to the droplet volume, here 250 nL, the lysozyme concentration could not be considered constant if the nucleation time was too long, explaining the saturation effect observed. In practice, the average number of crystals per droplet no longer varied linearly with nucleation time. We therefore chose to use 15 min <  $\Delta t$  < 2 h (Figure 3a).

**3.2. Primary Nucleation Rates.** Table 1 summarizes the results of the nucleation experiments. Figure 3a shows that the time dependence of the average number of crystals nucleated in one droplet is linear, confirming steady state nucleation. Another important result is that, for all experimental conditions except the highest supersaturation, straight lines pass through the axis origins, indicating that the data are not affected by heterogeneous nucleation.<sup>9</sup> The presence of crystals at  $\Delta t = 0$  for a lysozyme concentration of 55 mg/mL indicates that this solution is near its limit of metastability (Figure 1) and nucleation probably occurs during transfer to the incubator, after filling. Thus, in Figure 3b we plot the nucleation rate or nucleation frequency,  $J$ . Here, we only need to recall that<sup>16</sup>

$$J = K_0 \exp - \left( \frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3(kT)^3 \ln^2 \beta} \right) \quad (1)$$

where  $K_0$  is a pre-exponential factor,  $\Omega$  is the volume of a molecule inside the crystal ( $3.10^{-20}$  cm<sup>3</sup> for tetragonal lysozyme<sup>9</sup>),  $\gamma$  is the crystal–solution interfacial free energy (J·m<sup>-2</sup>),  $k$  is the Boltzmann constant ( $1.3805 \times 10^{-23}$  J·K<sup>-1</sup>),  $T$  is temperature (K), and  $\beta$  is the

supersaturation,  $\beta = C/C_s$ , where  $C$  is the solution concentration and  $C_s$  is the solubility ( $C_s = 3.17$  mg/mL in 0.7 M NaCl at pH = 4.5<sup>17</sup>). From the data presented in Figure 3b we found  $\gamma = 0.62$  mJ/m<sup>2</sup>, a value in good agreement with previous determinations from lysozyme nucleation experiments under the same conditions: 0.51–0.64 mJ/m<sup>2</sup> for the Vekilov group<sup>9,18</sup> and 0.91 mJ/m<sup>2</sup> for the Fraden group.<sup>15</sup> Moreover, our kinetic data are also in good agreement with the data of Galkin and Vekilov<sup>9</sup> obtained for the same NaCl concentration at 12.6 °C (Figure 3b).

**3.3. Discussion.** The experimental results presented above demonstrate that microfluidics is a direct, accurate, and fast method to measure  $J$ . Our results also confirm that at this scale, 250 nL, nucleation kinetics is not affected by volume; that is, to say there are no confined volume effects. As our aim was to obtain reliable statistical data with the minimum quantity of materials, each experimental condition requires only one droplet storage device, i.e. up to 200 droplets, which consumes less than 30 mg of lysozyme for the entire experiments presented here. However, we can expect to measure  $J$  in smaller chip channels; for instance, a decrease in channel diameter from 500 to 100  $\mu$ m decreases droplet volume from 250 nL to 2 nL. In so doing, we would consume no more than 0.3 mg of lysozyme.

Finally, one of the limitations involved in measuring  $J$  is the supersaturation range over which the experiment can be performed. When  $\beta$  is too low, heterogeneous nucleation can replace homogeneous nucleation. When  $\beta$  is too high,  $J$  is difficult



to measure because it is too rapid. In practice, we are able to measure the nucleation frequency only in the vicinity of the metastable zone limit. In this paper, we show that when experimental volume is diminished, the range of experimentally measurable  $J$  is increased. For instance, Galkin and Vekilov<sup>9</sup> announced a dynamic range of nucleation rates accessible to their technique from  $\sim 0.7$  to  $\sim 0.007$  nuclei/mL·s. Here, with a four times lower volume, we access a range from  $\sim 3$  to  $\sim 0.3$  nuclei/mL·s, thus increasing the supersaturation range experimentally accessible (Figure 3b).

#### 4. CONCLUSIONS

Here we measure lysozyme nucleation kinetics using an easy-to-use and simply constructed microfluidics setup. We confirm that microfluidics is a direct, accurate, and fast method to measure nucleation frequency using only a few milligrams of molecules. Moreover, our microfluidics setup, by diminishing crystallizer volumes, increases the experimental supersaturation range accessible. It would be interesting to test the effect on nucleation of even smaller volumes, as small volume systems offer promising properties.<sup>19,20</sup>

The advantage of this methodology and setup is its application to all water-soluble molecules, whether mineral, organic, or biological. We are now working on a setup using organic solvents with many potential applications, for instance for pharmaceutical molecules.

#### AUTHOR INFORMATION

##### Corresponding Author

\*Phone: 336 6292 2866. Fax: 334 9141 8916. E-mail: veesler@cinam.univ-mrs.fr.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank M. Audiffren (ANACRISMAT) and T. Bactivelane for their technical help. We thank N. Ferte for protein characterization and fruitful discussions. We thank M. Sweetko for English revision.

#### REFERENCES

- (1) Li, L.; Mustafi, D.; Fu, Q.; Tereshko, V.; Chen, D. L.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (51), 19243–19248.
- (2) Shim, J.-U.; Cristobal, G.; Link, D. R.; Thorsen, T.; Fraden, S. Using Microfluidics to Decouple Nucleation and Growth of Protein. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7* (11), 2192–2194.
- (3) Squires, T. M.; Quake, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77* (3), 977.
- (4) Leng, J.; Salmon, J. B. Microfluidic crystallization. *Lab Chip* **2009**, *9*, 24–34.
- (5) Laval, P.; Salmon, J.-B.; Joanicot, M. A microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics. *J. Cryst. Growth* **2007**, *303*, 622–628.
- (6) Laval, P.; Crombez, A.; Salmon, J.-B. Microfluidic Droplet Method for Nucleation Kinetics Measurements. *Langmuir* **2009**, *25* (3), 1836–1841.
- (7) Ildefonso, M.; Revalor, E.; Punniyam, P.; Salmon, J. B.; Candoni, N.; Veesler, S. Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool. *J. Cryst. Growth* **2010** accepted.

- (8) Tsekova, D.; Dimitrova, S.; Nanev, C. N. Heterogeneous nucleation (and adhesion) of lysozyme crystals. *J. Cryst. Growth* **1999**, *196* (2–4), 226–233.
- (9) Galkin, O.; Vekilov, P. G. Direct determination of the nucleation rates of protein crystals. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (3), 10965–10971.
- (10) Revalor, E.; Hammadi, Z.; Astier, J. P.; Grossier, R.; Garcia, E.; Hoff, C.; Furuta, K.; Okutsu, T.; Morin, R.; Veesler, S. Usual and Unusual Crystallization from Solution. *J. Cryst. Growth* **2010**, *312*, 939–946.
- (11) Anna, S. L.; Bontoux, N.; Stone, H. A. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82* (3), 364–366.
- (12) Joanicot, M.; Ajdari, A. Droplet Control for Microfluidics. *Science* **2005**, *309* (5736), 887–888.
- (13) Laval, P.; Giroux, C.; Leng, J.; Salmon, J.-B. Microfluidic screening of potassium nitrate polymorphism. *J. Cryst. Growth* **2008**, *310* (12), 3121–3124.
- (14) Laval, P.; Lisai, N.; Salmon, J. B.; Joanicot, M. A microfluidic device based on droplet storage for screening solubility diagrams. *Lab Chip* **2007**, *7*, 829–834.
- (15) Selimovic, S.; Jia, Y.; Fraden, S. Measuring the Nucleation Rate of Lysozyme using Microfluidics. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9* (4), 1806–1810.
- (16) Boistelle, R.; Astier, J. P. Crystallization mechanisms in solution. *J. Cryst. Growth* **1988**, *90*, 14–30.
- (17) Cacioppo, E.; Pusey, M. L. The solubility of the tetragonal form of hen egg-white lysozyme from pH 4.0 to 5.4. *J. Cryst. Growth* **1991**, *114*, 286–292.
- (18) Galkin, O.; Vekilov, P. G. Are nucleation kinetics of protein crystals similar to those of liquid droplets?. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (1), 156–163.
- (19) Grossier, R.; Magnaldo, A.; Veesler, S. Ultra-fast Crystallization due to Confinement. *J. Cryst. Growth* **2010**, *312*, 487–489.
- (20) Grossier, R.; Veesler, S. Reaching one single and stable critical cluster through finite sized systems. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9* (4), 1917–1922.